

SPECIFICATION

TRANSPORTER GENES

5 Technical Field

The present invention relates to transporters, proteins involved in transport of substances from the outside to the inside of cells or vice versa.

10 Background Art

Recently, the involvement of various transporters localized on the plasmamembrane in the uptake system for nutrients and endogenous substances into cells and their transport mechanisms have been clarified (Tsuji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996). These transporters recognize the structures of substances to be transported to selectively transport specific substances. Transporters that recognize the relatively wide range of structures may possibly recognize foreign substances such as drugs by mistake, and actively take in them into cells. It is believed that drugs permeate through the plasmamembrane fundamentally by simple diffusion depending on their physicochemical properties such as molecular size, hydrophobicity, and hydrogen-binding capacity. Particularly, in the case of ionic drugs, only molecules in the non-dissociated form can permeate through the plasmamembrane according to the pH partition hypothesis. However, it has become evident that a number of drugs penetrate through the cell membrane by a specific mechanism other than simple diffusion, that is, an active transport mediated by transporters, in organs that require efficient exchange of intracellular and extracellular substances, including small intestine, uriniferous tubule, placenta, epithelial cells of choroid plexus, hepatocytes, and blood-brain barrier (Tamai, I. and Tsuji, A., Pharmacia, 31, 493-497, 1995; Saito, H. and Inui, K., Igaku no Ayumi, 179, 393-397, 1996; Tamai, I., Yakubutsu Dotai

(Pharmacokinetics), 11, 642-650, 1996). For example, it is known that although oral β -lactam antibiotics of the non-esterified type are amphoteric or negatively charged in physiological pHs and sparingly soluble in fat, they are readily absorbed through the intestine. The transport study using the isolated membrane-vesicles system demonstrated that an H⁺-driven peptide transporter localized on the brush-border is involved in the absorption process of these drugs (Tsuji, A. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 241, 594-601, 1987). Although the specificity of a peptide transport system in terms of the peptide size is so strict as to recognize di- or tri-peptides but not tetrapeptides or larger peptides, it has a rather broad substrate specificity to recognize peptides comprising non-natural amino acids. The peptide transporter mediates transport of β -lactam antibiotics mistakenly due to its broad substrate specificity. This property has been unexpectedly utilized in the clinical field (Tsuji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995). Furthermore, a possibility that a transporter is also involved in permeation of substances with a high hydrophobicity such as fatty acids through the plasmamembrane has been reported (Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994).

Since various transporters are supposed to be distributed in organs and cells based on the physiological roles of the organs and cells, their distribution and functions may be specific to organs. Therefore, transporters are expected to be used to impart an organ specificity to pharmacokinetics. In other words, an organ-specific drug delivery system (DDS) can be constructed utilizing transporters. If drug absorption solely relied on simple diffusion is improved by elevating its hydrophobicity, an effect of the drug obtained in the initial transport in the liver can be enhanced and the drug can non-specifically translocate into any organ. In addition, it would also be possible to increase the drug absorption independently of its fat-solubility by designing the drugutilizing the substrate specificity of transporters (Hayashi, K. et al., Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996). For this purpose, it is necessary to identify

various transporters at the molecular level and analyze their properties in detail. However, their molecular level identification are greatly behind studies on their membrane physiology because they are difficult to handle biochemically and require complicated processes in their functional assays.

Recently, cDNAs of several transporters have been cloned by the expression cloning method using *Xenopus* oocytes, a foreign gene expression system, and structural homology among them has been revealed (Fei, Y.-J. et al., *Nature*, 368, 563-566, 1994). For example, Koepsell et al. cloned an organic cation transporter, OCT1, which is assumed to be localized on a basement membrane, using the expression cloning method in 1994 (Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994). Subsequently, OCT2 was identified by homology cloning based on the sequence of OCT1 (Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224, 500-507, 1996). OCT1 and OCT2 show homology as high as 67% to each other (Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 10408-10413, 1997). Both of them are intensely expressed in the kidney, but differ in the organ distribution; OCT1 is also expressed in the liver, colon, and small intestine, while OCT2 expression is specific to the kidney.

Only a few reports on identification of transporters at the molecular level, including the reports, are available, and there would be many unknown transporters that may be clinically useful.

Disclosure of the Invention

An object of this invention is to provide a family of novel transporter genes, proteins encoded by these genes, and their use.

The present inventors have screened a fetal gene library constructed using the subtractive method by random sequencing based on a working hypothesis that fetal genes include those which are involved in various disorders including cancer and are specifically or intensely expressed in fetal tissues. The inventors discovered an unknown gene showing a significant homology with those for organic cation transporters, OCT1 and OCT2, and attempted to isolate this gene, which was assumed to encode

a novel transporter. Thus, the inventors succeeded in isolating the desired gene by screening a cDNA library derived from human fetus. Furthermore, the inventors studied the transporter activity of a protein encoded by the isolated human gene and found
5 that the protein, in fact, functioned as a transporter for various organic cations. The inventors also succeeded in isolating a mouse gene corresponding to the isolated human gene.

This invention relates to a family of novel transporter genes, proteins encoded by these genes, and their use, and more
10 specifically to:

(1) a protein comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 1, 3, 22, or 27, or a protein comprising said amino acid sequence in which one or more amino acid residues are substituted, deleted, or added, and having an activity to transport an organic
15 cation;

(2) a protein encoded by a DNA hybridizing to a DNA comprising nucleotide sequence according to SEQ ID NOs: 2, 4, 23, or 28, and having an activity to transport an organic cation;

(3) a DNA encoding the protein according to (1) or (2);

20 (4) a vector comprising the DNA according to (3);

(5) a transformant expressibly carrying the DNA according to (3);

(6) a method for producing the protein according to (1) or (2), the method comprising culturing the transformant according to (5);

25 (7) an antibody that binds to the protein according to (1) or (2); and

(8) a DNA specifically hybridizing to a DNA comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOs: 2, 4, 23, or 28, and consisting of at least 15 nucleotides.

30 Nucleotide sequences of cDNAs of novel human transporters isolated by the present inventors are shown in SEQ ID NO: 2 (designated as "human OCTN1") and SEQ ID NO: 4 (designated as "human OCTN2"), respectively. Amino acid sequences of proteins encoded by these cDNAs are shown in SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 3,

respectively. Amino acid sequences of these two proteins included in the transporter proteins of this invention showed such a high overall homology as about 76%, and both of them retained the following consensus sequence which is conserved in various types of transporters including the glucose transporter: [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala] (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987). In fact, these proteins have an activity to transport various organic cations (see Examples 6 to 8).

The present inventors also isolated mouse genes corresponding to the above-described human OCTN1 and human OCTN2. Nucleotide sequences of the isolated cDNAs are shown in SEQ ID NO: 23 (designated as "mouse OCTN1") and SEQ ID NO: 28 (designated as "mouse OCTN2"), respectively. Amino acid sequences of proteins encoded by these cDNAs are shown in SEQ ID NOs: 22 and 27, respectively.

Transporter proteins of this invention also include those having the additional activity to transport substances other than organic cations as far as they retain the organic cation transport activity. Organic cations include, for example, TEA, carnitine, quinidine, and pyrilamine, but are not limited to them. They also include carcinostatic agents such as actinomycin D, etoposide, vinblastine, daunomycin, etc. Transporter proteins of this invention include those having the activity to transport organic cations not only from the outside to the inside of cells but also from the inside to the outside of cells.

Transporter proteins of this invention can be prepared as recombinant proteins using recombination techniques or natural proteins. Recombinant proteins can be prepared, for example, as described below, by culturing cells transformed with DNA encoding proteins of this invention. Natural proteins can be isolated from the kidney and cancer cell strains such as Hela S3, which highly express the proteins of this invention, by the method well known to those skilled in the art, for example, affinity chromatography

using an antibody of this invention described below. The antibody may be either polyclonal or monoclonal. A polyclonal antibody can be prepared by purifying serum obtained from, for example, a small animal such as a rabbit immunized with proteins of this invention by known methods, for example, ammonium sulfate precipitation, protein A or protein G column, DEAE-ion exchange column chromatography, affinity column chromatography coupled with the protein of this invention, etc. A monoclonal antibody can be prepared by immunizing a small animal such as a mouse with the protein of this invention, excising the spleen from the mouse, grinding the tissue into cells, fusing them with mouse myeloma cells using a fusing agent such as polyethylene glycol, and selecting a clone that produces an antibody to proteins of this invention out of fused cells (hybridomas) thus produced. Then, hybridomas thus selected are transplanted into the abdominal cavity of a mouse, and the ascites is collected from the mouse. A monoclonal antibody thus obtained can be purified by, for example, ammonium sulfate precipitation, protein A or protein G column, DEAE-ion exchange column chromatography, affinity column chromatography coupled with the protein of this invention, etc. When the antibody thus obtained is administered to human subjects, a humanized antibody or a human antibody is advantageously used to reduce the immunogenicity. An antibody can be humanized by, for example, the CDR grafting method comprising cloning an antibody gene from monoclonal antibody-producing cells and grafting the epitope portion thereof into an existing human antibody. A human antibody can be prepared by the usual method for preparing a monoclonal antibody except for immunizing a mouse whose immune system is replaced with the human's.

It is also possible for those skilled in the art to prepare proteins having functions equivalent to the transporter proteins of this invention (human OCTN1, human OCTN2, mouse OCTN1, and mouse OCTN2) by appropriately modifying amino acid residues of the proteins by, for example, substitution, using well known methods. Mutation of amino acids of the proteins can occur also spontaneously. Such mutant proteins which are obtained by altering the amino acid sequence of the transporter proteins of

this invention by substitution, deletion, or addition of amino acid residues, and are functionally equivalent to those of the transporter proteins are also included in the proteins of this invention. Herein, "functionally equivalent" means that
5 proteins have an activity to transport organic cations. Methods well known to those skilled in the art for altering amino acids include, for example, the site-specific mutagenesis system by PCR (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland), site-specific mutagenesis by oligonucleotide (Kramer, W. and Fritz, H. J. (1987) Methods
10 in Enzymol., 154: 350-367), Kunkel's method (Methods Enzymol., 85, 2763-2766 (1988)), etc. The number of amino acids that can be substituted is usually 10 amino acid residues or less, preferably 6 or less, and more preferably 3 or less. The site of substitution, deletion, or addition of amino acid residues is
15 not particularly limited as far as the activity of proteins of this invention is retained. It is possible to detect the transporter activity of proteins, for example, by the method described below in Example 6.

It is routine for those skilled in the art to obtain proteins
20 functionally equivalent to the transporter proteins of this invention by isolating and using DNAs highly homologous to the DNA sequences encoding the transporter proteins of this invention (human OCTN1, human OCTN2, mouse OCTN1, and mouse OCTN2) or portions thereof using hybridization techniques (Sambrook, J. et
25 al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989), etc. These proteins functionally equivalent to those of transporter proteins of this invention are also included in proteins of this invention. Here, "functionally equivalent" means that proteins have an activity to transport organic cations.
30 DNAs that hybridize to the DNAs encoding the proteins of this invention can be isolated from other organisms, for example, rats, rabbits, cattle, etc. as well as humans and mice. Especially, tissues such as the kidney are suitable as sources of such DNAs. These DNAs isolated using hybridization techniques usually have
35 a high homology with the above-described DNAs encoding the transporter proteins of this invention. "High homology" means at least 70% or more, preferably at least 80% or more, and more

preferably at least 90% or more of amino acid sequence identity. Sequence homology is determined according to algorithm described in a literature (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730).

5 One example of hybridization conditions for isolating such DNAs is as follows. That is, after the pre-hybridization at 55°C for 30 min or more in the "ExpressHyb Hybridization Solution" (CLONTECH), a labeled probe is added, and hybridization is performed by heating the reaction mixture at 37°C to 55°C for 1
10 h or more. Then, the reaction product is successively washed in 2 x SSC and 0.1% SDS three times at room temperature for 20 min, and then in 1 x SSC and 0.1% SDS once at 37°C for 20 min. More preferable conditions are as follows. After the pre-hybridization at 60°C for 30 min or more in the "ExpressHyb
15 Hybridization Solution" (CLONTECH), a labeled probe is added, and hybridization is performed by heating the reaction mixture at 60°C for 1 h or more. Then, the reaction product is successively washed in 2 x SSC and 0.1% SDS three times at room temperature for 20 min, and then in 1 x SSC and 0.1% SDS twice at 50°C for 20 min.
20 Still more preferable conditions are as follows. After pre-hybridization at 68°C for 30 min or more in the "ExpressHyb Hybridization Solution" (CLONTECH), a labeled probe is added, and hybridization is performed by heating the reaction mixture at 68°C for 1 h or more. Then, the reaction product is successively washed
25 in 2 x SSC and 0.1% SDS three times at room temperature for 20 min, and then in 0.1 x SSC and 0.1% SDS twice at 50°C for 20 min.

The present invention also relates to DNAs encoding the above-described transporter proteins of this invention. DNAs of this invention may be cDNA, genomic DNAs, and synthetic DNAs. The
30 DNAs of the present invention can be used for producing proteins of this invention as recombinant proteins. That is, it is possible to prepare proteins of this invention as recombinant proteins by inserting DNAs encoding proteins of this invention (e.g. DNAs comprising the nucleotide sequences set forth in SEQ ID NOS: 2,
35 4, 23, and 28) into an appropriate expression vector, culturing transformants obtained by transfecting suitable cells with the

vector, and purifying the proteins thus expressed. Cells to be used for producing recombinant proteins include, for example, mammalian cells such as COS cells, CHO cells, NIH3T3 cells, etc., insect cells such as Sf9 cells, yeast cells, *E. coli*, and so on.

5 Vectors used for the intracellular expression of recombinant proteins vary depending on host cells, including, for example, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids Res., 1990, 18(7), p5322), etc. for mammalian cells, "BAC-to-BAC baculovirus expression system" (GIBCO BRL), etc. for insect cells, "Pichia

10 Expression Kit" (Invitrogen), etc. for yeast cells, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), etc. for *E. coli*. Host cells can be transformed with vectors, for example, by the calcium phosphate method, the DEAE-dextran method, the method using cationic liposome DOTAP (Boehringer Mannheim), the

15 electroporation method, the calcium chloride method, etc. Recombinant proteins can be purified from recombinants thus obtained using standard methods, for example, as described in "The QIAexpressionist Handbook, Qiagen, Hilden, Germany."

The present invention also relates to DNAs consisting of at

20 least 15 nucleotides that specifically hybridize to the DNAs encoding proteins of this invention. Herein, "specifically hybridize" means that a DNA does not cross-hybridize to other DNAs encoding other proteins under usual hybridization conditions, preferably under the stringent hybridization conditions. Such

25 a DNA can be utilized as a probe for detecting and isolating DNA encoding the protein of this invention, and as a primer for amplifying the DNA.

The transporter proteins of this invention can be used to control internal absorption and dynamics of drugs. Based on the

30 results of detailed analysis of the substrate specificity of transporter proteins of this invention, drugs can be designed so as to be transported by these transporters and absorbability of the drugs mediated by these transporter proteins can be improved. Conventional modifications to enhance hydrophobicity are no

35 longer necessary for drugs so designed, which enables speedily and efficiently developing water-soluble drugs that are easy to

handle. The drugs thus developed is thought to be absorbed principally depending on the internal distribution pattern of transporter proteins of this invention, and an organ-specific delivery of the drugs thus becomes possible. Especially, if the
5 transporter proteins of this invention are distributed in the target organ of a drug, an ideal drug delivery system (DDS) can be developed. If a drug is to be absorbed mediated by not the transporter proteins of this invention but other transporters, the drug can be designed so as to be specific to other transporter
10 proteins by designing it considering the substrate specificity of the transporter proteins of this invention. Since the transporter proteins of this invention are present in the kidney, it is possible to reduce the nephrotoxicity produced by a drug by designing the drug so that it can be readily excreted by the
15 transporter proteins of this invention.

Another possible application of this invention is to develop a drug targeting the transporter proteins of this invention. The transporters play important roles in the absorption mechanism of nutrients and drugs, or the excretion mechanism of drugs and
20 internal metabolites. Thus, damage or abnormal elevation of the transporter's functions may cause some disorders. It is considered to be efficacious against such disorders to administer a drug containing a compound that inhibits or enhances functions of the transporter proteins of this invention, or regulates the
25 expression level of the transporter gene of this invention and the amount of the transporter proteins. The DNAs of this invention can be used in gene therapy for disorders caused by abnormalities in the activity and expression of the proteins of this invention. In this case, the DNA of this invention are inserted to an
30 adenovirus vector (e.g. pAdexLcw), a retrovirus vector (e.g. pZIPneo), etc., and administered into the body by either *ex vivo* method or *in vivo* method. Gene therapy can also be performed by administering a synthetic antisense DNA to the body either directly or after inserted into the above-described vector.

35 Especially, since "OCTN2" included in the transporter proteins of this invention efficiently transports carnitine,

chemotherapy with compounds to control the activity of "OCTN2" or gene therapy using the "OCTN2" gene is considered to be efficacious against various pathological conditions such as fatty liver, myocardiopathy, myopathy, etc. caused by hypocarnitinemia.

5 The transporter proteins of this invention are expressed in a variety of cancer cell strains, which suggests that the proteins may transport drugs into tumor cells. If this is the case, it is possible to develop carcinostatics that will be readily absorbed mediated by the transporter proteins of this invention.
10 On the contrary, mechanisms to transport and excrete substances by the transporter proteins of this invention may function to excrete carcinostatics in tumor cells so that the cells acquire resistance to drugs. If the transporter proteins of this invention are involved in a mechanism of tumor cells to acquire
15 drug resistance, a carcinostatic effect can be enhanced by a combined use of inhibitors of the transporter proteins of this invention with carcinostatics.

Brief Description of the Drawings

20 Fig. 1 represents hydrophobicity plots of human OCTN1 and human OCTN2 according to Kyte & Doolittle's calculating formula with a window of nine amino acid residues. Numerals on the plots indicate putative transmembrane regions.

25 Fig. 2 represents electrophoretic patterns showing the results of Northern blot analysis of human OCTN1.

30 Fig. 3 compares the amino acid sequence of human OCTN1 with that of human OCTN2. Amino acid residues conserved in both transporters are shaded. Sequences coinciding with the consensus sequences of sugar transporter and the ATP/GTP binding site are indicated by "+" and "*, " respectively.

 Fig. 4 represents electrophoretic patterns showing the results of Northern blot analysis of human OCTN2.

 Fig. 5 is a graph showing the TEA-absorbing activity of human OCTN1. Clear circles represent untreated cells, and solid circles

represent human OCTN1-transfected cells.

Fig. 6 is a graph showing effects of the cold TEA added in the experimental system in Fig. 5. In this graph, solid circles represent human OCTN1-transfected cells, and clear circles represent cells containing the vector with no insert. Clear triangles indicate the net uptake induced by human OCTN1 obtained by subtracting the clear circle values from the corresponding solid circle values.

Fig. 7 is a graph showing TEA concentration-dependency of the TEA-absorbing activity of human OCTN1.

Fig. 8 is a bar graph showing the activity of the human OCTN1-transfected cells to absorb substances other than TEA.

Fig. 9 is a bar graph showing the results of transport experiments using *Xenopus* oocytes. Bars indicated with "OCTN1" and "Water" represent the uptake activity of the human OCTN1-injected cRNA oocytes and that of the water-injected oocytes (containing no cRNA), respectively. Uptakes of TEA, carnitine, mepyramine, quinidine, and actinomycin D were observed in human OCTN1 cRNA-injected oocytes, whereas water-injected oocytes exhibited almost no uptake activity.

Fig. 10 is a bar graph showing the results of transport experiments for carcinostatics in *Xenopus* oocytes. Bars indicated with "OCTN1" and "Water" represent the uptake activity of the human OCTN1 cRNA-injected oocytes and that of the water-injected oocytes (containing no cRNA), respectively. Uptakes of actinomycin D, etoposide, vinblastine, and daunomycin were observed in the human OCTN1 cRNA-injected oocytes.

Fig. 11 is a bar graph showing the results of transport experiments with human OCTN1 and human OCTN2 in HEK293 cells. Human OCTN1 has the efficient transport activity for TEA and human OCTN2 for carnitine.

Fig. 12 is a graph showing the results of Na⁺-dependency of the carnitine transport activity of human OCTN2. Human OCTN2 exhibits a time-dependent carnitine transport activity (clear circle) in the presence of Na⁺, while no such activity in the absence

of Na⁺ (solid circle), indicating that the carnitine transport activity of human OCTN2 depends on the presence of Na⁺.

Fig. 13 shows the expression of mouse OCTN1 and mouse OCTN2 genes detected by RT-PCR amplification in each tissue. G3PDH serves as a control, indicating that the amount of cDNA in each tissue is uniform.

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is described below in more detail with reference to examples, but is not construed being limited thereto.

Example 1 Construction of a subtraction library

A subtraction library was constructed using the PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (CLONTECH) principally according to the method of Luda Diatchenko (Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996).

First, double-stranded cDNAs were synthesized from poly(A)⁺ RNAs derived from human fetal liver and adult liver by the standard method using MMLV reverse transcriptase. These cDNAs were blunt-ended with T4 DNA polymerase and cleaved with RsaI. A part of the cDNAs derived from fetal liver (tester) was divided in two portions, and they were separately ligated to two different adapters, adapter 1 and adapter 2, respectively (Table 1). A 120-fold excess of cDNA derived from adult liver (driver) was added to each of the above-described tester samples. The mixture was heat-denatured and subjected to the primary hybridization at 68°C for 8 h. After these two reaction mixtures from the primary hybridization were mixed together without heat-denaturation, an excessive amount of the heat-denatured driver was further added thereto, and the mixture was subjected to the secondary hybridization at 68°C for about 16 h. The resulting reaction solution was diluted with a dilution buffer and incubated at 75°C for 7 min. After the shorter strands of adapters were removed, the reaction solution was used as a template for PCR. PCR using primers 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3', SEQ ID NO: 5) and 2 (5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3', SEQ ID NO: 6) corresponding to the

adapters selectively amplified only cDNAs having different adapters at their both ends (subtracted cDNAs) (suppression PCR). PCR was carried out using a portion of the resulting cDNA as a template, and nested PCR primers 1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3', SEQ ID NO: 7) and 2 (5'-AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT-3', SEQ ID NO: 8), which are further inwardly located from the PCR primers 1 and 2, to obtain products with further elevated selectivity. PCR products thus obtained were purified using the QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN), and cloned into the pT7Blue-T vector (Novagen) by the TA cloning method to construct a subtraction library.

Table 1

Adapter 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3' 3'-GGCCCGTCCA-5'
Adapter 2	5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT-3' 3'-GCCTCCCGCCA-5'

Example 2 cDNA cloning

To analyze fetal genes, the subtraction library derived from the fetal liver was screened by random sequencing. Homology search (Blastx) of Expressed Sequence Tags (ESTs) thus obtained found a clone, OCTN1 (fls 631) (292 bp) encoding amino acid sequence having significant homology with the known organic cation transporters, OCT1 (Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994) and OCT2 (Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 500-507, 1996). Since the sequence of this clone was novel and assumed to be a fragment derived from a new transporter gene, cDNA comprising the whole open reading frame (ORF) of this gene was cloned.

The human fetal liver 5'-stretch cDNA library (CLONTECH) was screened using the original OCTN1 clone obtained from the subtraction library derived from fetal liver as a probe. An insert of the original OCTN1 clone was amplified by PCR using M13 P4-22 and M13 P5-22, and labeled with [α -³²P]dCTP by the random primer method using the Ready-to Go DNA labeling beads (Pharmacia) to

serve as a probe. Hybridization was carried out at 68°C in the ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH) according to the method recommended by the manufacturer. Final washing was performed at 50°C in 0.1 x SSC and 0.1% SDS. Screening about 5 x 10⁵ phage clones finally isolated seven positive clones. cDNA inserts of these clones were amplified by PCR using vector primers designed based on a sequence of the λgt10 vector (GT10 S1 5'-CTTTTGAGCAAGTTCAGCCT-3', SEQ ID NO: 9, and GT10 A1 5'-AGAGGTGGCTTATGAGTATTTCTT-3', SEQ ID NO: 10), or primers designed based on the decoded cDNA sequences. The PCR products thus obtained were directly sequenced to determine the nucleotide sequences. Some regions that were difficult to be amplified were subjected to PCR using 7-deaza dGTP as a substrate base (McConlogue, L. et al., Nucleic Acids Res., 16, 9869, 1988).

Sequencing of cDNA inserts of these clones revealed that the human OCTN1 gene contains an ORF encoding a protein consisting of 551 amino acid residues (putative molecular weight of about 62,000). Data base search using this whole amino acid sequence confirmed that it has a significant overall homology (about 34%) with OCT1 and OCT2. Hydrophobicity profile of this sequence obtained by Kyte & Doolittle's calculating formula (Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982) very closely resembled those of OCT1 and OCT2, indicating that the sequence has eleven to twelve putative transmembrane hydrophobic regions (Fig. 1). This sequence contained one consensus sequence of sugar transporter, ([Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala]), (160 to 175). This consensus sequence is present in the glucose transporters GLUT1 to GLUT7 in mammalian cells, and also present in various types of transporters other than glucose transporters (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987). Furthermore, putative N-linked glycosylation sequences (N-X-[ST]) were found in the amino acid sequence of human OCTN1 at four sites (57 to 59, 64 to 66, 91 to 93, and 304 to 306), and also five putative protein kinase C phosphorylation sites ([ST]-X-[RK]) (164 to 166, 225 to

227, 280 to 282, 286 to 288, and 530 to 532). In addition, the consensus sequence ([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr]) of the ATP/GTP binding site is also found. This consensus sequence of the ATP/GTP binding site is also present in the ATP binding protein or GTP binding protein, such as kinases and ras family proteins, and that ATP or GTP binds to this site (Walker, J. E. et al., EMBO J., 1, 945-951, 1982). This sequence is present in the so-called ATP Binding Cassette (ABC) type transporter, and involved in the substance transport using the energy generated by hydrolysis of ATP (Higgins, C. F. et al., J. Bioenerg. Biomembr., 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., J. Biol. Chem., 270, 26956-26961, 1995). Presence of this consensus sequence indicates that OCTN1 protein may be an ATP or GTP-dependent transporter.

Nucleotide sequencing was performed by the cycle-sequencing method with a plasmid DNA prepared by the alkaline-SDS method or a PCR product obtained by colony PCR, etc. as a template using the ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmplyTaq DNA Polymerase, FS, followed by decoding with the ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Colony PCR was carried out by directly suspending a colony of a recombinant in a PCR reaction solution containing vector primers M13 P4-22 (5'-CCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3', SEQ ID NO: 11) and M13 P5-22 (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3', SEQ ID NO: 12). After the completion of PCR, a DNA insert thus amplified was separated from unreacted primers and nucleotides by gel filtration, etc. to serve as a template for sequencing.

Example 3 Northern analysis

Distribution of human OCTN1 in tissues was investigated by Northern analysis (Fig. 2). A 3'-end fragment of human OCTN1 (the latter half from around the base 1,100) was labelled with [α -³²P]dCTP by the random primer method using the Ready-to Go DNA labeling beads (Pharmacia) to serve as a probe. Hybridization was performed using the Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human III, Human IV, Human Fetal II, and Human Cell lines (CLONTECH) at 68°C in the ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH) according to the method recommended by the manufacturer. Final

washing was performed at 50°C in 0.1 x SSC and 0.1% SDS. As a result, RNA of about 2.5 kb was strongly expressed in the fetal liver and adult-derived tissues such as the kidney, bone marrow, and trachea. Besides those tissues, the RNA band was also weakly detected in the fetal kidney and lung, and adult tissues including skeletal muscle, lung, placenta, prostate, spleen, and spinal cord. The RNA expression was also detected in tumor cell lines such as HeLa S3, K562, SW480, and A549, and especially, its very intense expression was observed in HeLa S3.

10 Example 4 Cloning of human OCTN2 cDNA

Data base search using the entire nucleotide sequence of "human OCTN1" detected very similar sequences thereto in several parts of the nucleotide sequence of P1 phage clones (P1 H24 clones, GenBank accession No. L43407, L43408, L46907, L81773, and L43409) derived from q regions of human chromosome 5. The parts having similarity with the nucleotide sequence of human OCTN1 are separated by the sequences having no similarity to the human OCTN1 sequence. The sequence obtained by connecting these similar parts with each other with reference to the sequence of human OCTN1 has a high homology over a wide range with human OCTN1, indicating the presence of OCTN1 homologues. The genomic sequence registered in data base was an incomplete one without covering the entire coding region, and, from only this sequence, it was impossible to know the complete structure of a protein partially encoded by the sequence. Therefore, cDNA cloning of this OCTN1 homologous gene (OCTN2) was performed to determine the coded protein structure. First, 631R S4 primer (5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTCA-3', SEQ ID NO: 13) and 631R A1 primer (5'-AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG-3', SEQ ID NO: 14) were prepared based on sequences of these P1 phage clones. PCR was performed using a set of these primers and cDNA synthesized from poly(A)⁺ RNA derived from the human adult kidney (CLONTECH) as a template, under the following conditions: 1 cycle of 94°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, and 72°C for 2 min,; and 1 cycle of 72°C for 10 min, resulting in amplification of about 900 bp fragment. This fragment was subcloned into the pT7Blue-T vector

(Novagen) by the TA cloning method to determine its nucleotide sequence, which clearly showed a very high overall homology with human OCTN1. Therefore, this gene was designated as human OCTN2, and longer cDNAs were cloned.

5 The cDNA library derived from the human kidney was screened using the cDNA insert of this clone as a probe in the same manner as for human OCTN1 cDNA cloning, and cDNA containing the entire coding region of human OCTN2 was cloned by a procedure for isolating longer clone and the Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) method
10 (Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995), CLONTECHniques X, 5-8), etc. to determine its structure (SEQ ID NO: 4). Specifically, the RACE method was carried out as follows. The 631R S6 primer (5'-AGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTT-3', SEQ ID NO: 15) was prepared. PCR was performed using this primer and the
15 Marathon-Ready™ cDNA derived from the human adult kidney (CLONTECH) as a template under the following conditions: 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 3 min,; and 72°C for 10 min, resulting in amplification of about 1.7 kbp cDNA fragment of the 3'-end. This fragment was subcloned into
20 the pT7Blue-T vector by the TA cloning method to determine its structure.

 It became evident that human OCTN2 contains an open reading frame (ORF) encoding a protein consisting of 557 amino acid residues. Fig. 3 compares amino acid sequences of human OCTN1
25 and human OCTN2. Both showed overall amino acid homology as high as about 76%. In addition, one consensus sequence (160 to 176) of sugar transporter was present in the amino acid sequence of human OCTN2 like human OCTN1. These facts indicated that human OCTN2 can be a novel transporter that is structurally related to
30 human OCTN1. Furthermore, a consensus sequence (218 to 225) of the ATP/GTP binding site was also present in the amino acid sequence of human OCTN2 like in human OCTN1.

Example 5 Northern analysis

 Northern analysis was performed using about 900 bp human OCTN2
35 cDNA as a probe which was obtained by PCR with a set of 631R S4 primer (5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTC-3', SEQ ID NO: 13) and 631R

Al primer (5'-AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG-3', SEQ ID NO: 14) in the same manner as for human OCTN1. The results are shown in Fig. 4. Although the expression pattern of human OCTN2 partly overlapped with that of human OCTN1, human OCTN2 differs from human OCTN1 in that the former was very intensely expressed in the kidney among fetal tissues, while the latter was strongly expressed also in cancer cell strains such as K-562, HeLa S3, SW480, etc. as well as the kidney, indicating that OCTN1 and OCTN2 may be involved in transport of substances such as carcinostatics in these cancer cells.

Example 6 Forced expression of human OCTN1 in human fetal kidney cells (HEK293) and its activity determination

Phage DNAs were extracted from positive phage clones obtained by screening the clones by the plaque hybridization method using the QIAGEN Lambda Kit (QIAGEN). After the DNA insert was subcloned into the pUC18 vector, cDNA containing the entire ORF which was cleaved out with SmaI and EcoRI was integrated between the EcoRI site and the blunted HindIII site of an expression vector for mammalian cells, pCDNA3 (Invitrogen), to obtain an expression plasmid DNA, pCDNA3/OCTN1. Plasmid DNA was prepared by alkaline-SDS method using the QIAGEN PLASMID MAXI Kit (QIAGEN).

The human fetal kidney-derived cell strain, HEK 293 cells were transfected with the plasmid pCDNA3/OCTN1 and pCDNA3 vector containing no insert as a control by the calcium phosphate method. First, the plasmid DNA (10 μ g), a Hepes buffer solution (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM Dextrose, and 21 mM Hepes pH 7.1) (1 ml), and 2M CaCl_2 (62.5 μ l) were combined and allowed to stand at room temperature for 30 min or more to form calcium phosphate coprecipitates. After cells were plated on 10-cm plates at 1.5×10^6 cells per plate and cultured for 24 h, the calcium phosphate coprecipitates were added thereto, and the cells were further cultured for 24 h. Then, plates were washed with phosphate buffered saline (PBS), and the cells were further cultured for 24 h after the addition of fresh culture medium.

Transport experiment was performed using cells transfected with the plasmid DNA or untreated cells according to the following

procedures. Cells were detached from plates using a rubber policeman, suspended in a transport buffer (containing 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM (+)-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 25 mM Hepes pH 7.4), and pre-incubated for 20 min.

5 An appropriate amount of each labeled substrate ([¹⁴C]TEA (tetraethylammonium) (NEN), [³H]carnitine (L-carnitine hydrochloride) (Amersham), [³H]PCG (benzylpenicillin) (Amersham), [³H]quinidine (ARC), or [³H]pyrilamine (mepyramine) (Amersham)) was then added to the cell suspension, and the resulting mixture

10 was incubated at 37 °C for a predetermined period of time. Incubated cells were overlaid on a silicon layer prepared by layering a mixture of silicon oil and liquid paraffin (specific gravity = 1.022) on a 3 M KCl layer, and separated by centrifugation. Radioactivity of cells was measured to determine the into-the-cell

15 transport activity. In this case, 1 x 10⁶ cells were used as one point of cells. HEK 293 cells were cultured in Dulbecco's MEM containing 10% fetal calf serum (FCS) in an atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C.

First, the transporter capacity was measured in the cells

20 transfected with pcDNA3/OCTN1 and untreated cells using TEA as a substrate (Fig. 5). A reaction time-dependent TEA uptake into the human OCTN1-transfected cells was clearly observed. This uptake was not observed in untreated cells. Next, effects of the addition of unlabeled TEA on the labeled substrate uptake in this

25 system (cold inhibition) was examined (Fig. 6). A decrease in the apparent uptake of the labeled substrate was clearly seen depending on the concentration of cold TEA added. In this experiment, almost no uptake of the substrate into cells was observed in cells transfected with the pcDNA3 vector containing

30 no insert (Mock) used as a control like in untreated cells used, clearly indicating that this uptake phenomenon is due to the transfection of the cells with human OCTN1. Next, to obtain the K_m (Michaelis constant) value of human OCTN1 to TEA, the uptake of [¹⁴C]-TEA with various concentrations was measured (Fig. 7). From

35 Lineweaver-Burk reciprocal plot of the net uptake obtained by subtracting the amount of the uptake in Mock cells from that in the human OCTN1-transfected cells, the K_m value of 0.44 ± 0.04 mM

was obtained with the maximal velocity, V_{max} of 6.68 ± 0.34 (nmol/3 min/mg). Next, the transport capacity of human OCTN1 for other substrate than TEA was examined (Fig. 8). When the transport capacity was measured using labeled organic cations such as labeled carnitine, quinidine, and pyrilamine, a significant increase in the uptake of these compounds was clearly observed in human OCTN1-transfected cells as compared with Mock cells, clearly indicating that these organic cations can serve as substrates for human OCTN1. However, no significant increase in the uptake of an organic anion, PCG (benzylpenicillin), was observed.

Example 7 Activity measurement of human OCTN1 using *Xenopus* oocytes

cRNA was synthesized *in vitro* using T7 RNA polymerase with pcDNA3/OCTN1 as a template. This cRNA was diluted to the concentration of 0.3 ng/nl, and its 50-nl (15 ng) aliquot was injected into a single oocyte. As a control, 50 nl of distilled water was injected. These oocytes were cultured for 3 days, and then used for the transport experiment. After being preincubated in an uptake buffer (0.05% Tween 80, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, and 10 mM Hepes pH 7.4) at 25°C for 20 min, the oocytes were transferred to the uptake buffer containing 0.5 ml of labeled substrate to initiate the uptake. After the incubation at 25°C for 1 h, the oocytes were washed in the ice-cold uptake buffer three times to terminate the reaction. The oocytes were solubilized in 5% SDS and mixed with Cleasol I (a cocktail for liquid scintillation counter) (3 ml) to determine the radioactivity. The radioactivity of the uptake buffer which contained the labeled compound at the time of incubation (external solution) (10 μ l) was also similarly measured. The ratio of the radioactivity (dpm value) in the oocytes to that (dpm value) in the external solution was used as the uptake activity.

Human OCTN1 also expresses the transport capacity for organic cations such as quinidine, mepyramine and carnitine, as well as TEA in this transport experiment system using *Xenopus* oocytes (Fig. 9).

Next, the transport capacity of human OCTN1 for carcinostatics, etc. was examined. The results revealed that human OCTN1 has the activity to transport actinomycin D, etoposide, vinblastine, and daunomycin (Fig. 10). These results strongly indicate that OCTN1 would be involved in the into-the-cell translocation mechanism (mechanism for absorption by cells) for these drugs, which have been clinically used as carcinostatics. By designing and screening drugs utilizing the substrate specificity of OCTN1 so as to be readily recognized by this transporter, it would be possible to efficiently develop useful drugs that can be readily absorbed by the cells.

Example 8 Forced expression of human OCTN2 in HEK cells and its activity measurement

The expression plasmid DNA for human OCTN2 in mammalian cells was prepared as follows.

A single-stranded cDNA was synthesized from poly(A)⁺ RNA derived from the human fetal kidney (CLONTECH) using the SuperScript[™] II reverse transcriptase (GIBCO BRL). PCR was performed using the thus-obtained cDNA as a template under the following conditions to amplify 5'- and 3'-end fragments of human OCTN2.

For the amplification of 5'-end fragment (about 800 bp) of human OCTN2, OCTN2 3 primer (5'-GATGGATCCCGGACGGTCTTGGGTCGCCTGCTG-3', SEQ ID NO: 16) and OCTN2 4 primer (5'-GATGGATCCAAATGCTGCCACATAGTTGGAGAT-3', SEQ ID NO: 17) were used. PCR was carried out using DNA polymerase ExTaq (TaKaRa) and dNTPs (150 μ M 7-deaza dGTP, 50 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, and 200 μ M dCTP) according to the following conditions: 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 63°C for 1 min, and 72°C for 2 min;; and 72°C for 10 min. For the amplification of 3'-end fragment (about 1.2 kbp) of human OCTN2, OCTN2 7 primer (5'-GATGGATCCATGGGCATGCAGACAGGCTTCAGC-3', SEQ ID NO: 18) and OCTN2 8 primer (5'-GATGGATCCTTCCTCTTCAGTTTCTCCCTTACT-3', SEQ ID NO: 19) were used. PCR was carried out using DNA polymerase ExTaq (TaKaRa) and dNTPs (200 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, and 200 μ M dCTP) according to the following conditions: 94°C for 2 min;

35 cycles of 94°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 2 min,; and 72°C for 10 min.

These fragments were respectively electrophoresed on agarose gel, excised from the gel, purified, and subcloned into the pT7Blue-T vector. Clones having no PCR error were selected by sequencing, and clones from both fragments were ligated at the PstI site in the overlapping region. Each ligated fragment was eventually incorporated into the BamHI site of the pcDNA3 vector, and used as the expression plasmid DNA pcDNA3/OCTN2.

HEK cells were transfected with pcDNA3/OCTN2, the pcDNA3 vector containing no insert (Mock), or pcDNA3/OCTN1 by the method described in Example 6 to perform transport experiments. It was proved that human OCTN2 has a high capacity to efficiently transport carnitine (Fig. 11). On the other hand, human OCTN2 hardly transported TEA, which were efficiently transported by human OCTN1, revealing that they clearly differ in their substrate specificities.

Next, Na⁺ dependence of human OCTN2-mediated carnitine transport was examined using a transport buffer in which Na⁺ was replaced with K⁺ (Fig. 12). The result showed that carnitine transport mediated by human OCTN2 completely depended on the presence of Na⁺, indicating that OCTN2 is a symport type transporter that transports substrates and Na⁺ in the same direction.

Example 9 Cloning of mouse OCTN1

Data base search using human OCTN1 cDNA sequence detected several Expressed Sequence Tags (ESTs) derived from mouse, which had very high homology to the human OCTN1 cDNA sequence. Based on these EST sequences, MONL 1 primer (5'-CGCGCCGAATCGCTGAATCCTTTC-3', SEQ ID NO: 20) and MONA 4 primer (5'-AGGCTTTTGATTTGTTCTGTTGAG-3', SEQ ID NO: 21) were prepared. PCR was performed using a set of these primers and cDNA prepared from poly(A)⁺ RNA derived from the mouse kidney as a template. As a result, fragments of about 2 kbp were amplified. These fragments were electrophoresed on agarose gels, excised from the gels,

purified, and subcloned into the pT7Blue T vector (Novagen) by the TA cloning method. The sequence of mouse OCTN1 was determined by sequencing plural clones. The nucleotide sequence of cDNA thus determined is shown in SEQ ID NO: 23, and amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA in SEQ ID NO: 22.

Example 10 Cloning of mouse OCTN2

First, MONB 20 primer (5'-CCCATGCCAACAAGGACAAAAAGC-3', SEQ ID NO: 24) was prepared from the sequence of human OCTN2 cDNA. The Marathon-Ready™ cDNA derived from the mouse kidney (CLONTECH) was used as a template for the 5'-Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) to clone the 5'-end sequence upstream of the primer. Next, data base search was performed using human OCTN2 nucleotide sequence to detect several ESTs derived from mouse, which had a very high homology with human OCTN2. MONB 26 primer (5'-ACAGAACAGAAAAGCCCTCAGTCA-3', SEQ ID NO: 25) was prepared from these EST sequences. MONB 6 primer (5'-TGTTTTTCGTGGGTGTGCTGATGG-3', SEQ ID NO: 26) was prepared from the sequence obtained by the 5'-RACE. PCR was performed using this primer and MONB 26 primer and cDNA prepared from poly(A)⁺ RNA derived from the mouse kidney as a template to amplify the 3'-end fragments. The sequence of mouse OCTN2 was determined by sequencing directly of after subcloning respective fragments. The nucleotide sequence of the cDNA thus determined is shown in SEQ ID NO: 28, and amino acid sequence of the protein encoded by the cDNA in SEQ ID NO: 27.

Example 11 Tissue expression analysis of mouse OCTN1 and mouse OCTN2

The expression amount of mouse OCTN1 and mouse OCTN2 genes in various tissues was examined by RT-PCR using a mouse Multiple Tissue cDNA (MTC) panel (CLONTECH) (Fig. 13). Primers used are MONL 1 and MONA 4 for mouse OCTN1, and MONB 6 and MONB 26 for mouse OCTN2. As a result, the high level expression of mouse OCTN1 was detected in the kidney and liver, while that of mouse OCTN2 in the kidney, liver, and 7-days old embryo.

Industrial Applicability

This invention provides a family of novel organic cation transporter genes and proteins encoded by these genes. Transporter proteins of this invention are useful for developing
5 newly designed drugs that can be transported mediated by these proteins, and pharmaceuticals for disorders caused by functional abnormalities of the proteins.

CLAIMS

1. A protein comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 1, 3, 22, or 27, or a protein comprising said amino acid sequence in which one or more amino acid residues are substituted, deleted, or added, and having an activity to transport an organic cation.
2. A protein encoded by a DNA hybridizing to a DNA comprising nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 2, 4, 23, or 28 and having an activity to transport an organic cation.
3. A DNA encoding the protein according to claim 1 or 2.
4. A vector comprising the DNA according to claim 3.
5. A transformant expressibly carrying the DNA according to claim 3.
6. A method for producing the protein according to claim 1 or 2, the method comprising culturing the transformant according to claim 5.
7. An antibody that binds to the protein according to claim 1 or 2.
8. A DNA specifically hybridizing to a DNA comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 2, 4, 23, or 28 and consisting of at least 15 nucleotides.

ABSTRACT

Novel genes significantly homologous to organic cation transporters OCT1 and OCT2 have been successfully isolated by
5 screening a fetal gene library by random sequencing. Proteins encoded by these genes function as transporters of various organic cations.

Figure 1

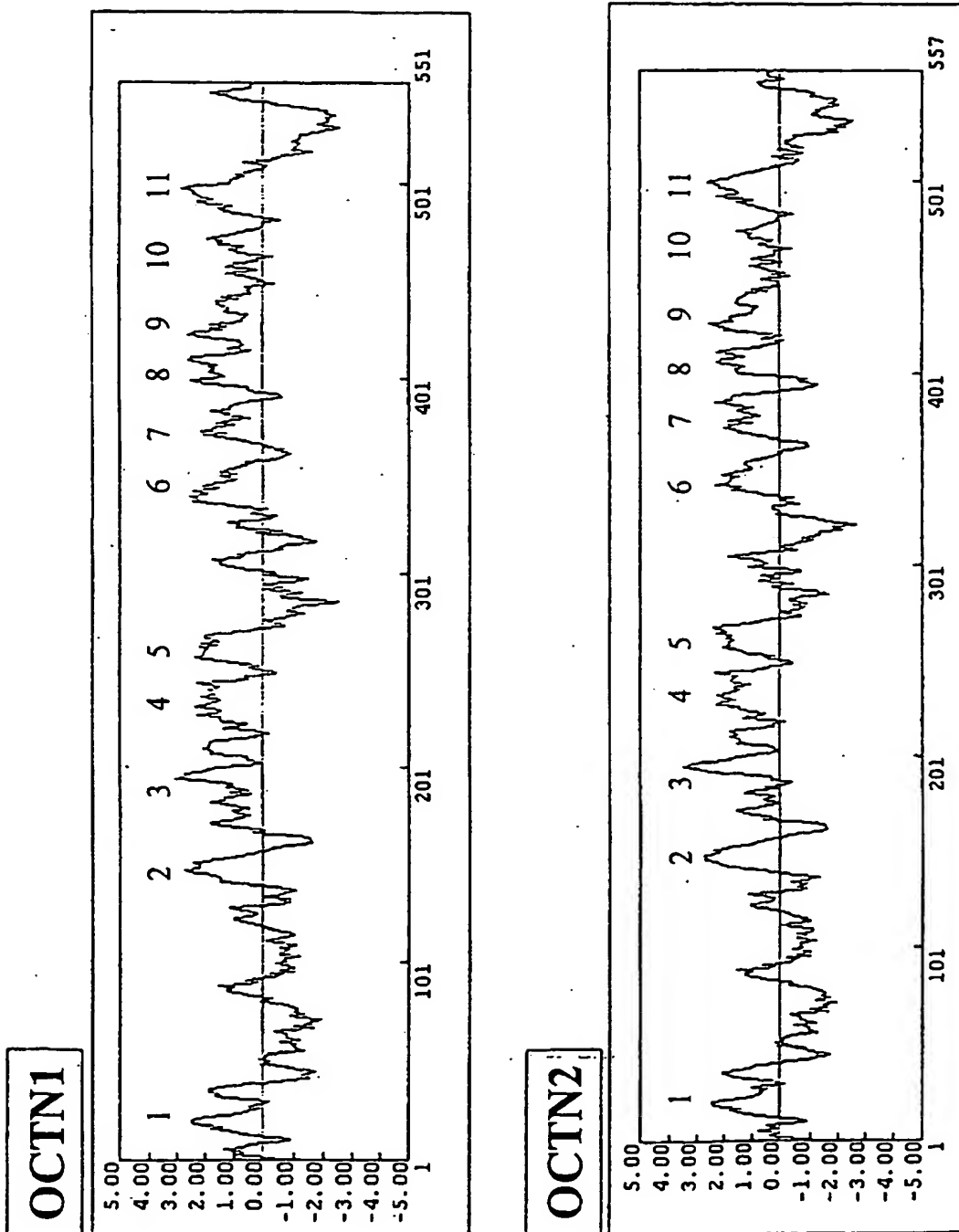


Figure 2

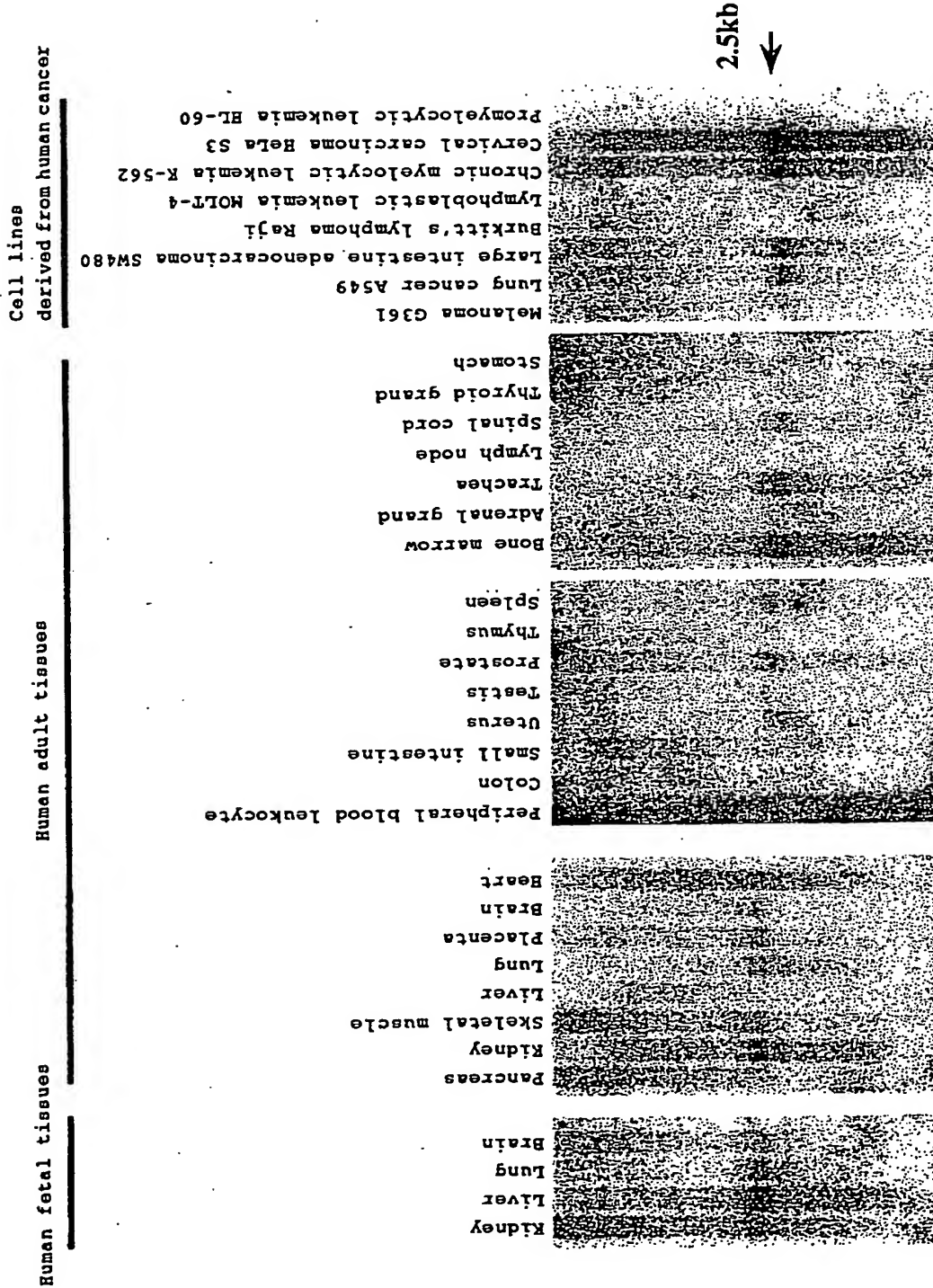


Figure 3

OCTN1	1	ARDVDEIAF	UGENGCEQRI	TEELISASQI	ENGNGQSVV	ELACPELRQ	KVEDANLESS	AVRNNVPLR	EROREVENS	ESRYRTATA	NESALGUEG
OCTN2	1	ARDVDEIAF	UGENGCEQRI	TEELISASQI	ENGNGQSVV	ELACPELRQ	KVEDANLESS	AVRNNVPLR	EROREVENS	ESRYRTATA	NESALGUEG
OCTN1	101	RDVDEGQEG	ESGEGGTEERS	QDVVESTVZI	ENVNGQDNV	KVPLTSURR	VGVNGSVS	COLSDREGR	NVEPATAVQ	IGSELOQES	ISWENIVLE
OCTN2	101	RDVDEGQEG	ESGEGGTEERS	QDVVESTVZI	ENVNGQDNV	KVPLTSURR	VGVNGSVS	COLSDREGR	NVEPATAVQ	IGSELOQES	KNFEMVLE
OCTN1	201	VINGMCOISN	WVABIGTE	UEKSYRUE	STUGVQIFA	VETLIRIFA	MEQDVRUE	LKVTVZVIG	PLVWTEPES	PRVUSQRR	REAEITQKA
OCTN2	201	VINGMCOISN	WVABIGTE	UEKSYRUE	STUGVQIFA	VETLIRIFA	MEQDVRUE	LKVTVZVIG	PLVWTEPES	PRVUSQRR	DEAEVIRKA
OCTN1	301	AKAANTAVRA	VTEDS--VEE	UNPLKQKAF	EDUFRRNT	ALNGMSLLI	MLTSVQYFA	ESDAPNHC	DAYLNGHSA	LIQTPAVITA	VEHRTERR
OCTN2	301	AKAANCIVPS	TTHPSELQD	ESSKICQSHN	EDULRHWV	RNVNMSIMI	MTIENRVEG	ESDPTENHC	DFVNGHLSA	MVVPANVLA	VEHRTERR
OCTN1	399	MITAVVAVWG	EGVHISIQV	EVVYFISIG	EVMLQKQD	SRSMLVFI	AEKELVRN	LAGVTSAS	RGSILAELE	WUCANRMD	PEDVNGSLV
OCTN2	401	MSVATAUELO	OSVAVRQV	EPDLVYATV	EVAVGQVU	AKSVVENV	VEHEDVRN	LAGVSSIAS	RGSILSPYB	WUCANRMD	PEDVNGSLV
OCTN1	499	UICVFFVFB	ESLGMTEDD	LEQVQKQWF	RSCK---	DSMETENPK	VJ-IDAE	551			
OCTN2	501	UTAVVUEH	ESFQTPEDD	IDQVLRVGM	KHRVTPSEH	MLKDCQBRHT	IEKSTAE	557			

Figure 4

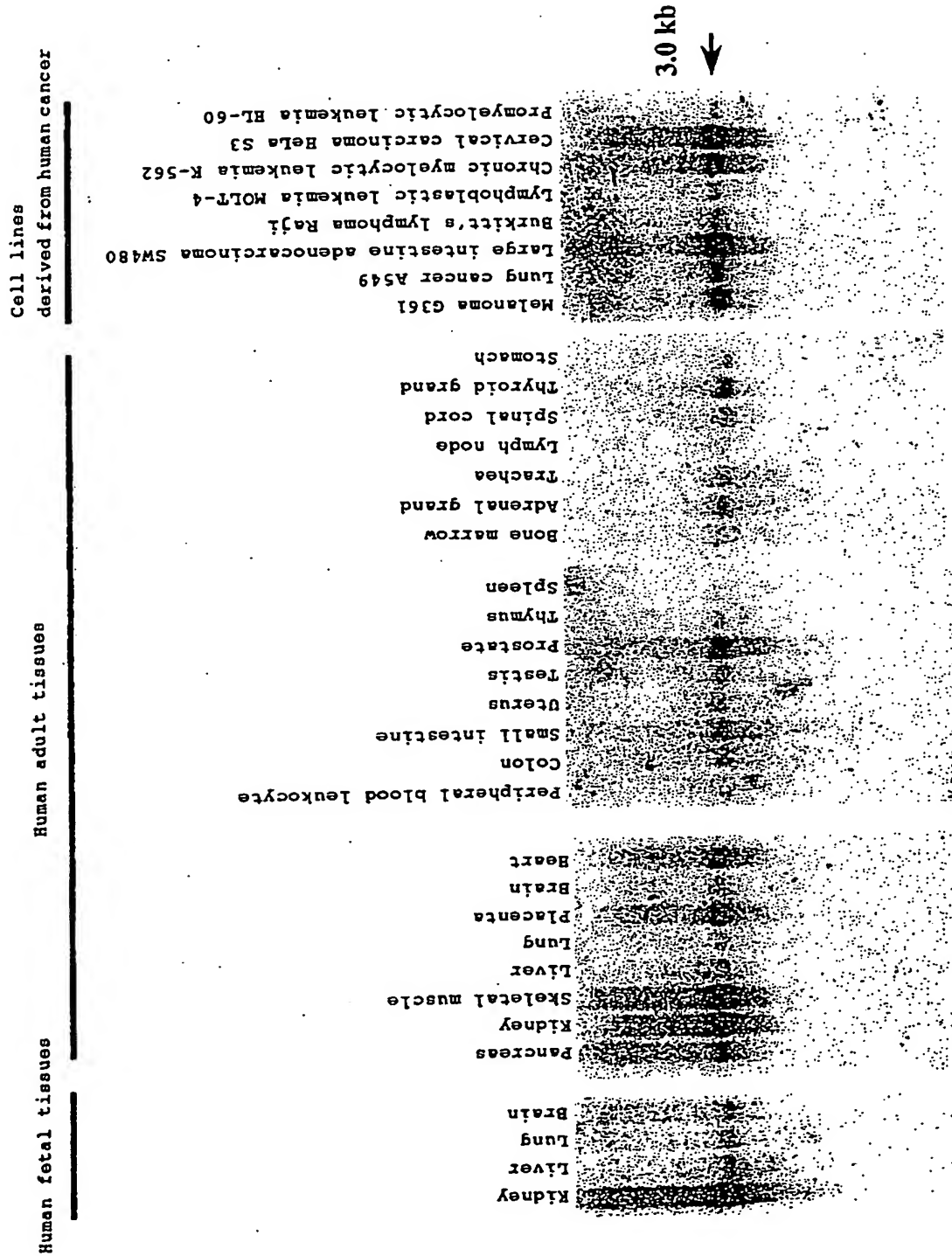


Figure 5

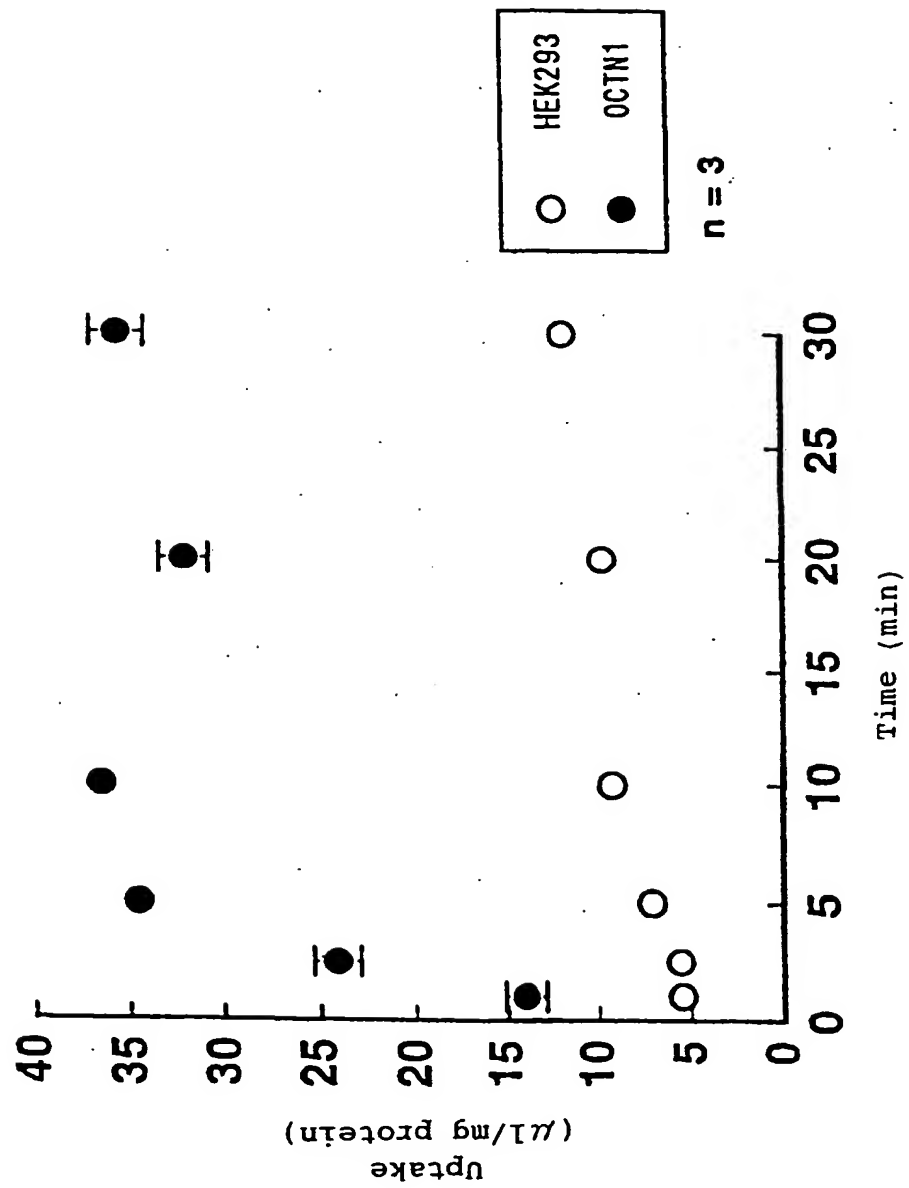


Figure 6

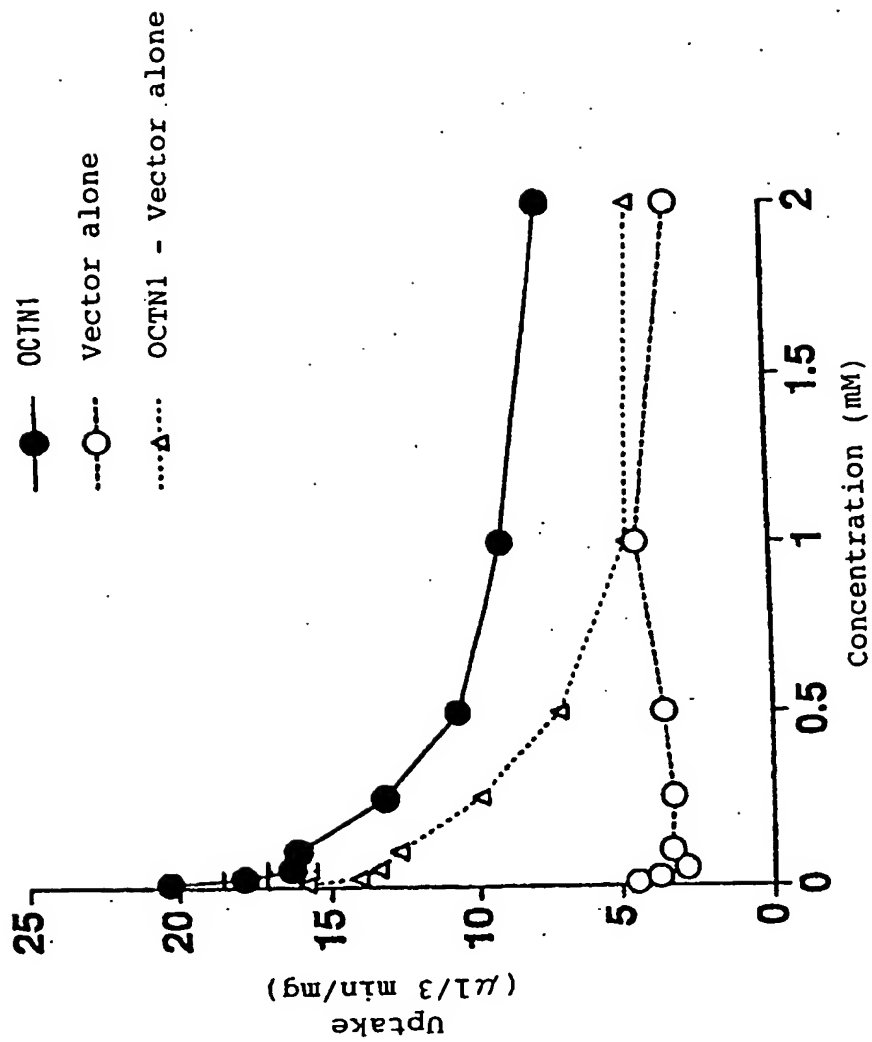


Figure 7

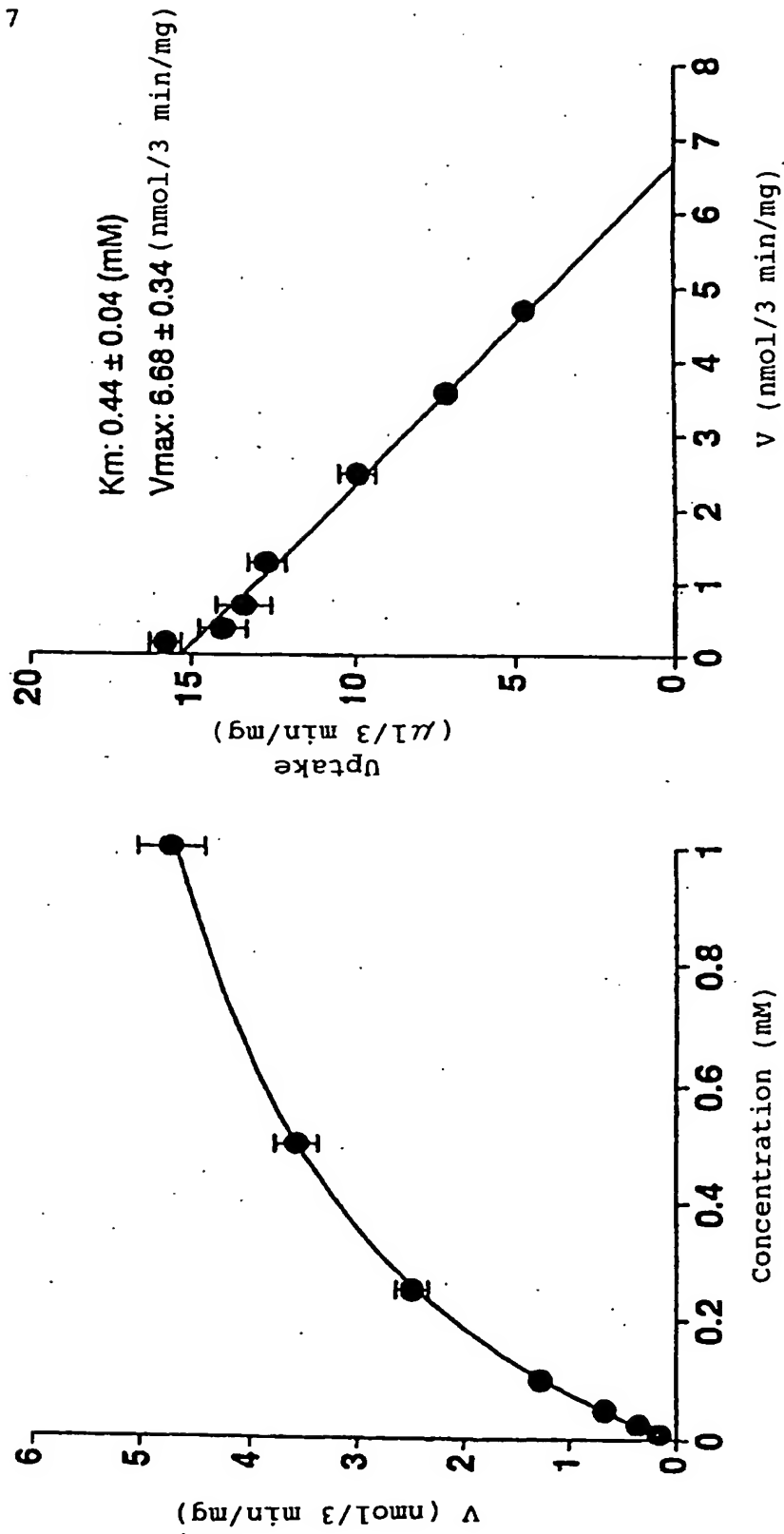


Figure 8

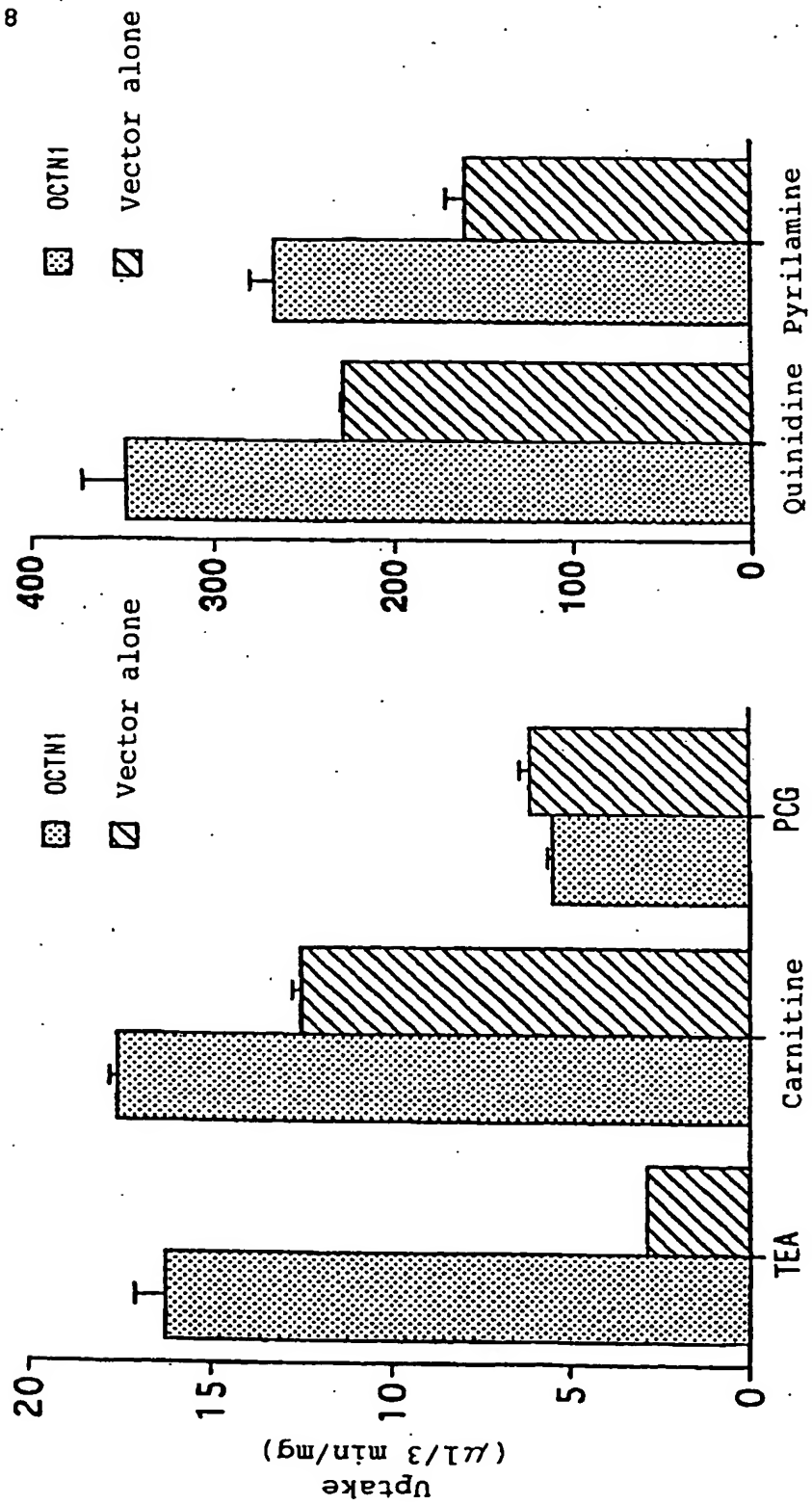


Figure 9

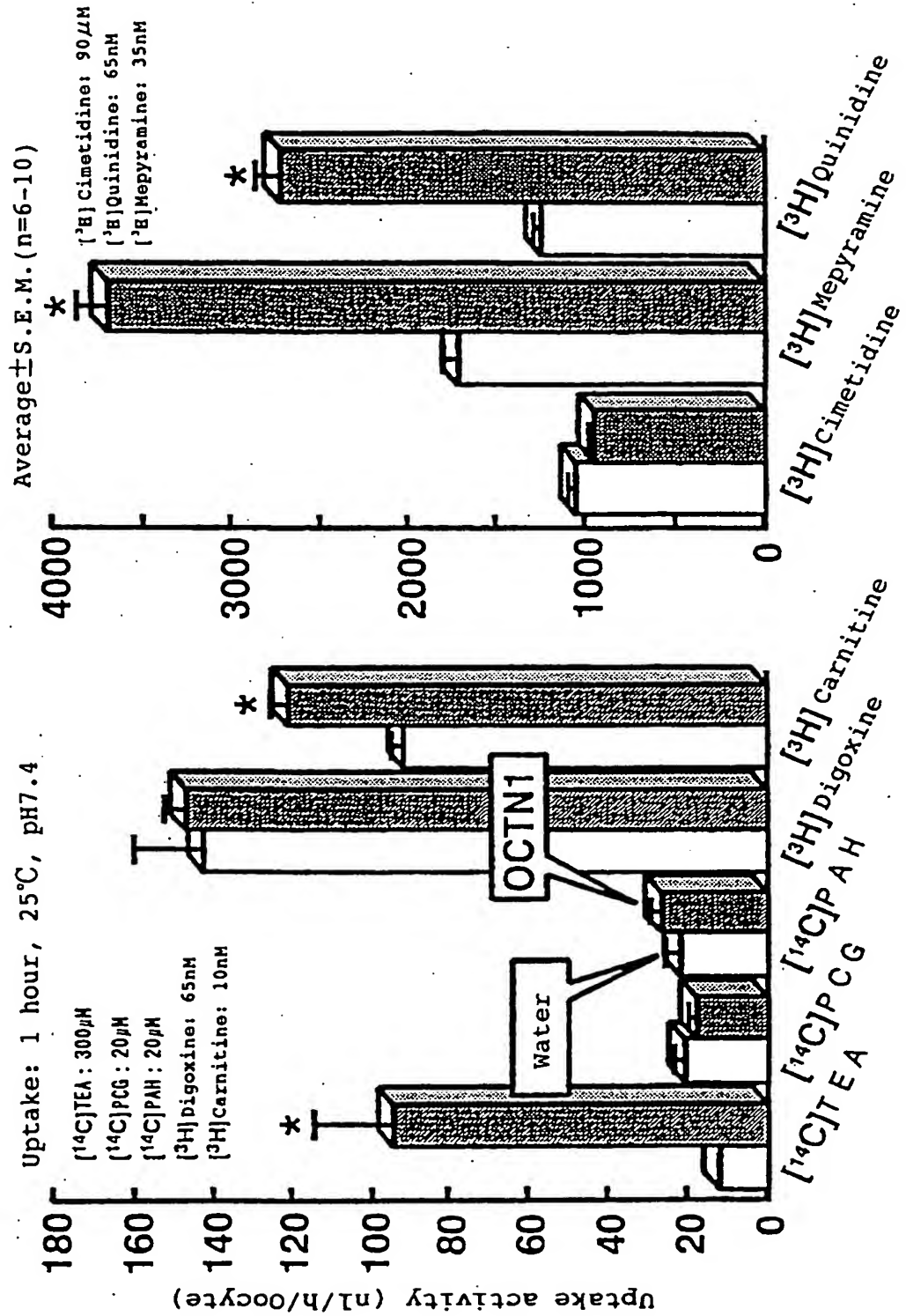


Figure 10

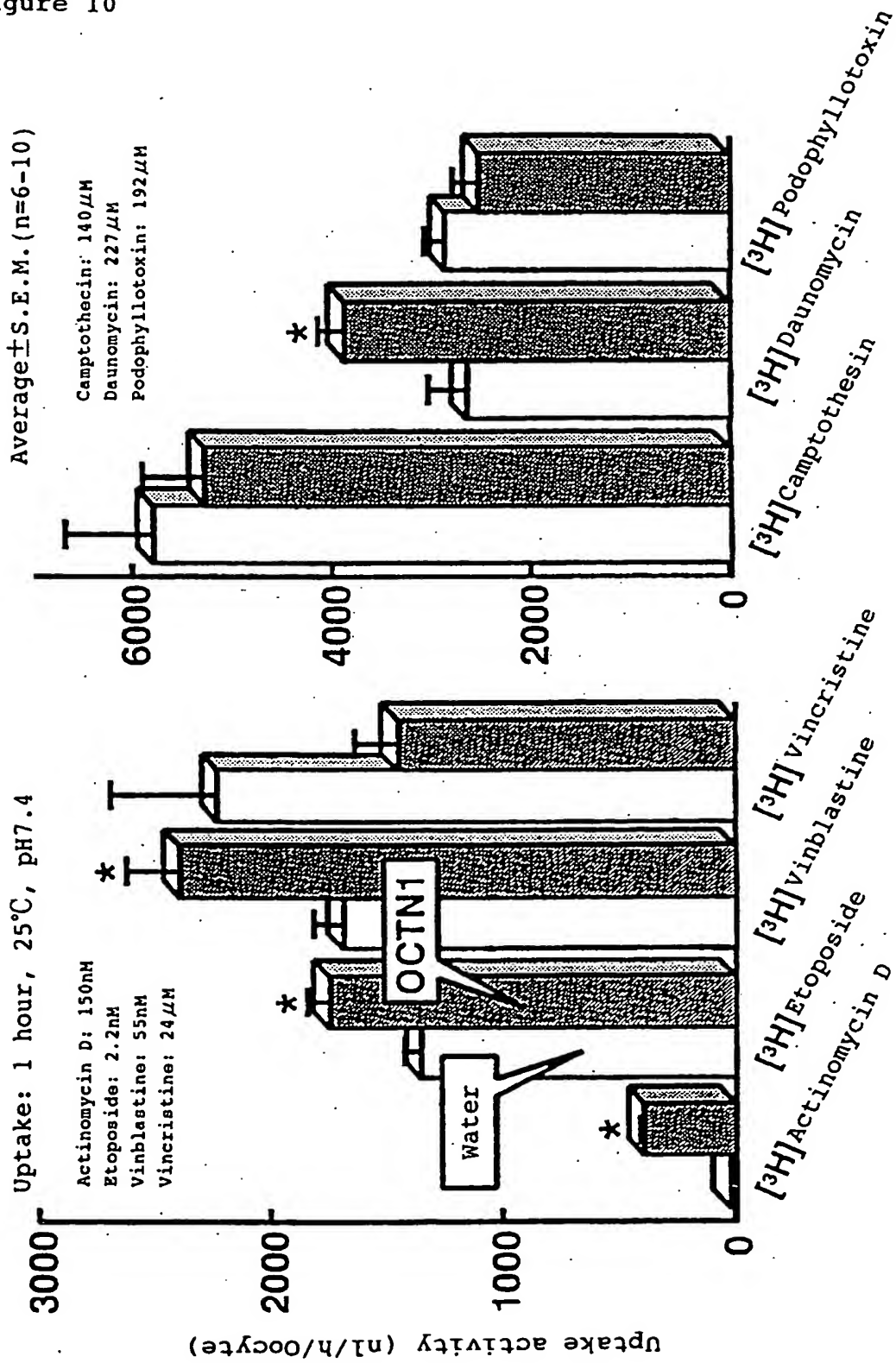


Figure 11

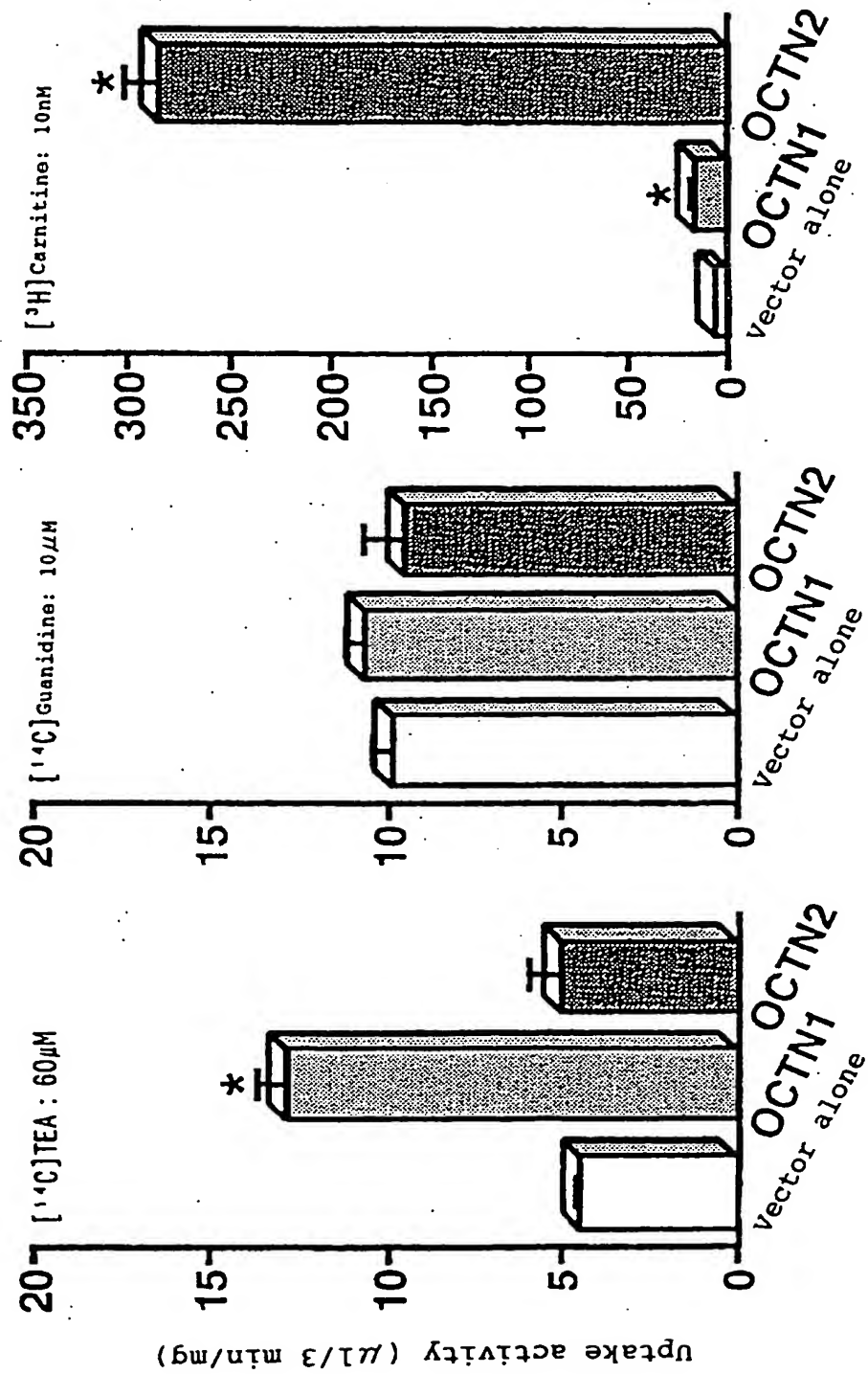
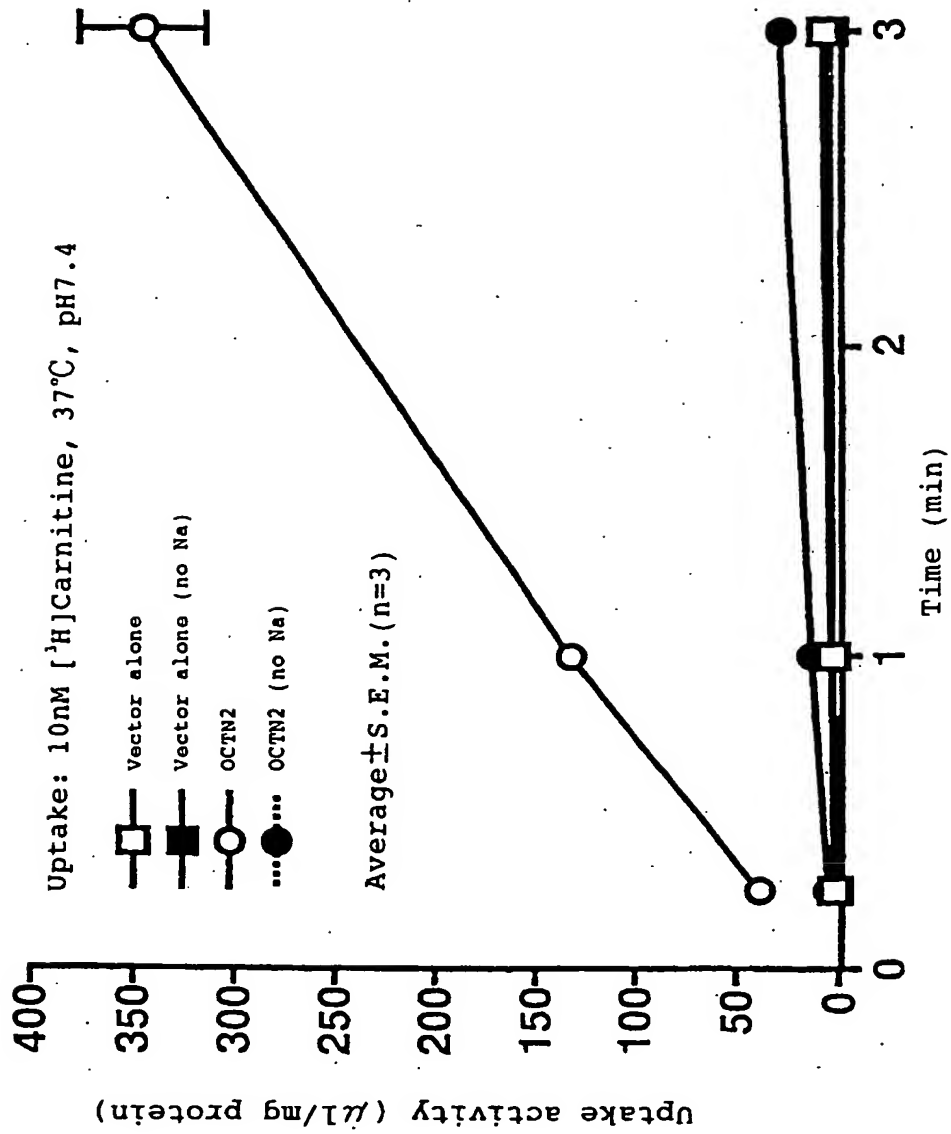
Uptake: 3 min, 37°C , pH 7.4Average \pm S.E.M. (n=3)

Figure 12



Embryo Adult Tissues

17 day
15 day
11 day
7 day
Testis
Kidney
Sk. Muscle
Liver
Lung
Spleen
Brain
Heart
No DNA

mouse OCTN 1

mouse OCTN 2

G3PDH

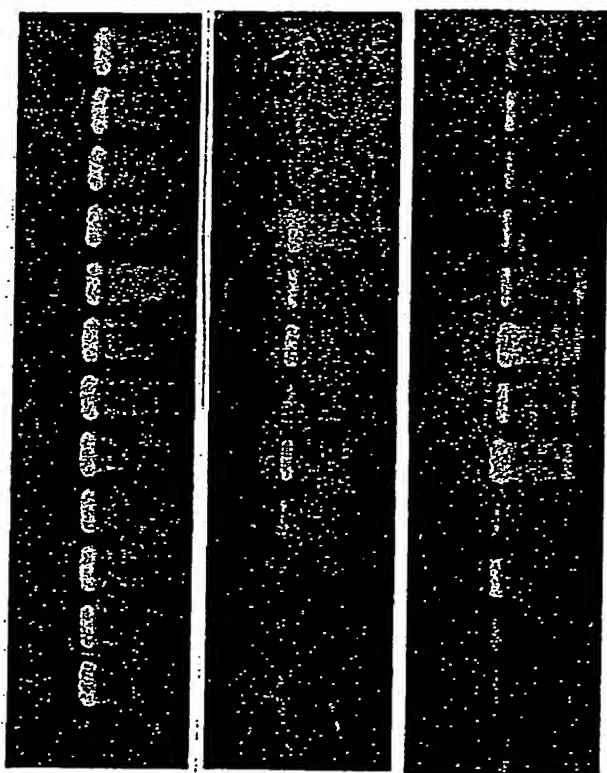


Figure 13



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 5/10, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/13072</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04009</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月7日(07.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/260972 1997年9月8日(08.09.97) JP 特願平10/156660 1998年5月20日(20.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 根津淳一(NEZU, Jun-ichi)[JP/JP] 奥 飛鳥(OKU, Asuka)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: TRANSPORTER GENES</p> <p>(54)発明の名称 トランスポーター遺伝子</p> <p>(57) Abstract Novel genes significantly homologous with organic cation transporters OCT1 and OCT2 which have been successfully isolated by screening a fetal gene library by random sequencing. Proteins encoded by these genes serve as transporters of various organic cations in practice.</p>		

(57)要約

胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行い、有機カチオントランスポーターOCT1およびOCT2と有意な相同性を示す新規な遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子がコードするタンパク質は実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

トランスポーター遺伝子

技術分野

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するタンパク質であるトランスポーターに関する。

背景技術

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある(Tsuji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.)。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみがpH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿細管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた(玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.)。例えば、非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は生理的pHにおいては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている。単離

膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在するH⁺駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示されるようになった(Tsuji, A. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 241, 594-601, 1987.)。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。 β -ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していたことになる(Tsuji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.)。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている(Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994.)。

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー(DDS)が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる(林喜代美 他: Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996.)。このような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定の複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れて

いる。

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル(*Xenopus*)卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターのcDNAがクローニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた(Fei, Y. -J. et al., *Nature*, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994年にKoepselらによって、基底膜型と推定される有機カチオントランスポーターOCT1が発現クローニング法によってクローニングされた(Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1の配列をもとにしたホモロジークローニングによってOCT2が同定された(Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)。OCT1とOCT2はお互いに67%という非常に高い相同性を示す(Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。

トランスポーターについての分子レベルでの同定については、これら報告例を含めわずかであり、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

発明の開示

本発明は、新規なトランスポーター遺伝子ファミリーおよびそれら遺伝子がコードするタンパク質、並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

本発明者等は、胎児組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子(fetal gene)の中には、癌をはじめとする各種疾患に関与する遺伝子が存在するとの作業仮説のもと、サブトラクション法によって作製した胎児遺伝子(fetal gene)ライブラリーのランダムシーケンシングによるスクリーニングを行ってきた。本発明者等はこの過程において、有機カチオントランスポーターOCT1およびOCT2と有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子が新規のト

ランスポーターをコードしていることが予想されたことから、本発明者等は、その単離を試みた。その結果、ヒト胎児由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的の遺伝子を単離することに成功した。さらに、本発明者等は、単離したヒト遺伝子がコードするタンパク質のランスポーター活性につき検討を行った。その結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのランスポーターとして機能することを見いだした。また、本発明者らは、単離したヒト遺伝子に対応するマウス遺伝子を単離することにも成功した。

本発明は、新規なランスポーター遺伝子ファミリーおよびそれら遺伝子がコードするタンパク質、並びにそれらの用途に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1、3、22若しくは27に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはこれらタンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (2) 配列番号：2、4、23若しくは28に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (3) (1)または(2)に記載のタンパク質をコードするDNA、
- (4) (3)に記載のDNAが挿入されたベクター、
- (5) (3)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、
- (6) (5)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)または(2)に記載のタンパク質の製造方法、
- (7) (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する抗体、
- (8) 配列番号：2、4、23若しくは28に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、に関する。

本発明者等が単離した新規なヒトランスポーターcDNAの塩基配列をそれぞれ

配列番号：2（「ヒトOCTN1」と命名した）および配列番号：4（「ヒトOCTN2」と命名した）に示す。また、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。本発明のトランスポータータンパク質に含まれるこれら2つのタンパク質のアミノ酸配列は全体に渡り、76%程度という非常に高い相同性を示し、ともにグルコーストランスポーターなど様々なタイプのトランスポーターに存在するコンセンサス配列[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala]) (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987.)を保持していた。実際に、これらタンパク質は、様々な有機カチオンを輸送する活性を有していた（実施例6から8参照）。

また、本発明者らは、上記「ヒトOCTN1」および「ヒトOCTN2」に対応するマウス遺伝子を単離した。単離したcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：23（「マウスOCTN1」と命名した）と配列番号：28（「マウスOCTN2」と命名した）に、これらcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：22と配列番号：27に示す。

本発明のトランスポータータンパク質としては、有機カチオンを輸送する活性を有すれば足り、該活性を有する限り有機カチオン以外の他の物質を輸送する活性をさらに有するものも含まれる。有機カチオンとしては、これらに制限されないが、例えば、TEA、カルニチン、キニジン、ピリラミンが挙げられる。また、抗がん剤であるアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンなどが挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質としては、細胞外から細胞内へ有機カチオンを輸送する活性を有するもののみならず、細胞内から細胞外へ有機カチオンを輸送する活性を有するものも含まれる。

本発明のトランスポータータンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換

えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、本発明のタンパク質の発現の高い腎臓やHeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体またはヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDRグラフト法などが挙げられる。また、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製こともできる。

また、当業者であれば、公知の方法を用いて上記本発明のトランスポータータンパク質（「ヒトOCTN1」、「ヒトOCTN2」、「マウスOCTN1」、「マウスOCTN2」）中のアミノ酸の置換などを適宜行い、これらと同等の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により上記本発明のトランスポータータンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、これらタンパク質と同等の機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム（GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland）、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法（Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367）、Kunkel法（*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)）などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。タンパク質のトランスポーター活性は、例えば、後述の実施例6に記載の方法により検出することが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）などを用いて、上記本発明のトランスポータータンパク質（「ヒトOCTN1」、「ヒトOCTN2」、「マウスOCTN1」、「マウスOCTN2」）をコードするDNA配列またはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のトランスポータータンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。これら本発明のトランスポータータンパク質と同等の機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。ハイブリダイズする

DNAを他の生物から単離する場合には、ヒトやマウス以外に、例えば、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に腎臓などの組織が単離に適している。このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAは、通常、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも80%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37°Cから55°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37°Cで20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、60°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。

また、本発明は、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAであっても、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を組換えタンパク質と

して生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2、4、23、28に記載の塩基配列からなるDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（E.coli）が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3（Invitrogen社製）やpEF-BOS（Nucleic Acids.Res.1990,18(17),p5322）などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL社製）などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP（ベリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法などを用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなDNAは、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。

本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能である。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となると考えられる。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えと考えられる。本発明のトランスポータータンパク質は腎臓に存在するため、逆に本発明のトランスポータータンパク質によって体外へ排出されやすい薬物を設計することにより、腎毒性等を軽減することも可能である。

また、他の本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を標的とした薬物の開発が考えられる。栄養物質や薬物の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することに起因する疾患が存在すると考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する化合物や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するするような化合物を薬剤として用いると効果的であると考えられる。さらに、本発明のDNAを利用して、本発明のタンパク質

の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことも考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。また、アンチセンス合成DNAを生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも考えられる。

特に、本発明のトランスポータータンパク質に含まれる「OCTN2」は、カルニチンを効率よく輸送する活性を有するため、低カルニチン血症を原因とする脂肪肝、心筋症、骨格筋症などの病態に対し、「OCTN2」の活性を制御する化合物による治療、あるいは「OCTN2」遺伝子を用いた遺伝子治療等が有効であると考えられる。

本発明のトランスポータータンパク質は種々の癌細胞株において発現しており、腫瘍細胞において本発明のトランスポータータンパク質が薬物を細胞内へ輸送し得る可能性がある。この場合には、本発明のトランスポータータンパク質によってより吸収されやすい抗腫瘍薬が創造できると考えられる。あるいは逆に、本発明のトランスポータータンパク質による物質の細胞外へ輸送、排出する機構が、腫瘍細胞においては抗腫瘍剤の排出として働き、腫瘍細胞が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性も考えられる。本発明のトランスポータータンパク質が腫瘍の薬剤耐性機構に関与しているならば、本発明のトランスポータータンパク質阻害剤を抗腫瘍剤と併用することにより、抗腫瘍効果を強化できると考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」の疎水性プロットを示す。Kyte&Doolittleの計算式による。Windowサイズは9アミノ酸である。数字は予想される膜貫通領域を示す。

図2は、「ヒトOCTN1」のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

図3は、「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のアミノ酸配列の比較を示す。一致

するアミノ酸は影付きで表す。糖トランスポーターのコンセンサス配列に一致する配列を「+」で、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列に一致する配列を「*」で示す。

図4は、「ヒトOCTN2」のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

図5は、「ヒトOCTN1」のTEAの吸収活性を示す。白丸は未処理の細胞、黒丸は「ヒトOCTN1」を導入した細胞を示す。

図6は、図5の実験系に対するコールドTEAの添加による影響を示す。図中の黒丸は「ヒトOCTN1」を導入した細胞、白丸はインサートを含まないベクターを導入した細胞、白三角は黒丸の値から白丸の値を差し引いた、正味の「ヒトOCTN1」による取り込み量を指す。

図7は、「ヒトOCTN1」におけるTEA吸収活性のTEA濃度依存性を示す。

図8は、「ヒトOCTN1」を導入した細胞におけるTEA以外の物質の吸収活性を示す図である。

図9は、Xenopus卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果を表す。「OCTN1」、「Water」と示したバーはそれぞれ、「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。

「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした卵母細胞へのTEA、カルニチン、メビラミン、及びキニジン及びアクチノマイシンDの取り込みが観察された。一方、cRNAを含まない水をインジェクトした卵母細胞はほとんど取り込み活性を示さなかった。

図10は、Xenopus卵母細胞を用いた抗癌剤のトランスポート実験の結果を表す。「OCTN1」、「Water」と示したバーはそれぞれ、「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。「ヒトOCTN1」cRNAをインジェクトした卵母細胞へのアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、及びダウノマイシンの取り込みが観察された。

図11は、HEK293細胞における「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のトランスポート実験の結果を表す。「ヒトOCTN1」はTEAを、また「ヒトOCTN2」はカルニチン

を効率よく輸送する活性を持つことがわかる。

図12は、「ヒトOCTN2」のカルニチン輸送活性に対するNaの依存性を調べた結果を示す。「ヒトOCTN2」はNa存在下、時間に依存したカルニチンの輸送活性を示す(白丸)が、この活性はNa非存在下には全く見られず(黒丸)、「ヒトOCTN2」のカルニチン輸送活性はNaの存在に依存していることがわかる。

図13は、「マウスOCTN1」および「マウスOCTN2」遺伝子の発現を各組織においてRT-PCRによって検出した図である。G3PDHはコントロールであり、各cDNA量がそろっていることを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] サブトラクションライブラリーの作製

サブトラクションライブラリーはPCR-Select™ cDNA Subtraction kit (CLONTECH社製)を用い、Luda Diatchenkoらの方法(Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

まずヒト胎児肝臓由来polyA⁺ RNA及びヒト成人肝臓由来polyA⁺ RNAよりMMLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。つぎにT4 DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA(テスター)の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2(表1)をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ120倍量の成人肝臓由来cDNA(ドライバー)を加え、熱変性を行ったあと68°Cで8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。つぎにこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のドライバーを加え68°Cで約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75°Cで7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を取り除いたものをPCRの鋳型として用いた。アダプターに対応するプライマーであるP

CRプライマー1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' / 配列番号: 5)、2 (5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3' / 配列番号: 6) を用いたPCRを行うことにより、両端に異なるアダプターを持ったcDNA (サブトラクトされたcDNA) のみを選択的に増幅した (サブプレッションPCR)。この一部を鋳型とし、PCRプライマー1、2のさらに内側に位置するプライマーであるNested PCRプライマー1 (5'-TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT-3' / 配列番号: 7) と2 (5'-AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT-3' / 配列番号: 8) を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物をQIAquick PCR Purification kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター(Novagen社製)にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブラリーとした。

【表 1】

アダプター1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT-3'
	3'-GGCCCGTCCA-5'

アダプター2	5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT-3'
	3'-GCCTCCCGCCA-5'

【実施例 2】 cDNAクローニング

胎児遺伝子の解析を目的に、胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行った。得られたEST(Expressed Sequence Tag)のホモロジーサーチ(Blastx)による解析から、既知の有機カチオントランスポーターであるOCT1(Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994.)、OCT2(Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 500-507, 1996.)と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードするクローン、「OCTN1(fl631)」(292bp)が見いだされた。このクローンの配列は新規なものであり、

新規のトランスポーター遺伝子由来の断片である可能性が推測されたことから、この遺伝子の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAのクローニングを行った。

胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーより得られた「OCTN1」オリジナルクローンをプローブとし、human fetal liver 5'-stretch cDNAライブラリー(CLONTECH社製)のスクリーニングを行った。「OCTN1」オリジナルクローンのインサートを、M13 P4-22とM13 P5-22を用いたPCRにより増幅し、これをReady-to Go DNA labelling beads(Pharmacia社製)を用いたランダムプライマー法により[α - 32 P]dCTPでラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションはExpressHyb Hybridization Solution(CLONTECH社製)中、68°Cで、メーカー推奨の方法に従い行った。また、最終的な洗浄は、0.1 X SSC、0.1% SDS、50°Cで行った。約 5×10^4 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンを単離された。これらのクローンのインサートcDNAを λ gt10ベクターの配列より設計したベクタープライマー(GT10 S1 5'-CTTTTGAGCAAGTTCAGCCT-3' / 配列番号: 9, GT10 A1 5'-AGAGGTGGCTTATGAGTATTTCTT-3' / 配列番号: 10)、あるいは解読されたcDNAの配列より設計したプライマーを用いたPCRによって増幅し、その産物を直接シーケンシングすることにより、塩基配列を決定した。一部の増幅が困難な領域については7-deaza dGTPを基質塩基として用いたPCRによる増幅を行った(McConlogue, L. et al., Nucleic Acids Res. 16, 9869, 1988.)。

これらのクローンのインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、「ヒトOCTN1」遺伝子は、551アミノ酸(推定分子量約62,000)からなるORFをコードし得る配列を持つことが明らかとなった。この全アミノ酸配列を用いてデータベースサーチを行ったところ、全体に渡ってOCT1及びOCT2と有意な相同性(約34%)を示すことが確認された。また、Kyte & Doolittleの計算式(Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982.)によって得られる疎水性プロフィールは、OCT1およびOCT2のものと非常に類似しており、11-12個の膜貫通領域と思われる

る疎水性領域が認められた(図1)。また、この配列中には1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列([Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala])が存在した(160-175)。このコンセンサス配列は、哺乳類細胞におけるグルコースのトランスポーターであるGLUT1~GLUT7に存在するコンセンサス配列であり、グルコーストランスポーター以外にも、様々なタイプのトランスポーターに存在することが知られている(Maiden, M. C. et al., *Nature*, 325, 641-643, 1987.)。「ヒトOCTN1」のアミノ酸配列中には、さらに、N型糖鎖が付加され得る配列(N-X-[ST])が4箇所(57-59, 64-66, 91-93, 304-306)見られる。また、プロテインキナーゼCによるリン酸化を受け得るサイト([ST]-X-[RK])も5箇所(164-166, 225-227, 280-282, 286-288, 530-532)存在した。さらに、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr])も存在する。このATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列はキナーゼやrasファミリータンパク等のATP結合タンパク、あるいはGTP結合タンパク質に存在し、この部位にATP,GTPが結合することが知られている(Walker, J. E. et al. *EMBO J.*, 1, 945-951, 1982)。また、ABC(ATP Binding Cassette)型トランスポーターと呼ばれるトランスポーターにはこの配列が存在し、ATPを加水分解することによるエネルギーを用いて物質を輸送していることが示されている(Higgins, C. F. et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 26956-26961, 1995))。このコンセンサス配列の存在により、「OCTN1」タンパク質がATPあるいはGTP依存的な輸送を行うトランスポーターである可能性も考えられる。

なお、塩基配列の決定は、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCRなどによるPCR産物を鋳型とし、ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmplyTaq DNA Polymerase,FSを用いた

サイクルシーケンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencer (PerkinElmer 社製) により解読した。コロニーPCRは、ベクタープライマーであるM13 P4-22(5' -CCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3' /配列番号: 11)及びM13 P5-22(5' -TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3' /配列番号: 12)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つコロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き、シーケンシングの鋳型として用いた。

[実施例3] ノーザン解析

「ヒトOCTN1」の組織分布をノーザン解析により調べた(図2)。「ヒトOCTN1」の3'側断片(約1,100番目の塩基より後半)を、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia 社製)を用いたランダムプライマー法により[α -³²P]dCTPでラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human III, Human IV, Human Fetal II, Human Cell line (CLONTECH社製)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社製)中で、メーカー推奨の方法に従い、68°Cでハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50°Cで行った。その結果、胎児では肝臓に、そして成人由来の臓器では、腎臓、骨髄、気管に約2.5kbの強い発現が観察された。それ以外には胎児の腎臓、肺、そして成人の骨格筋、肺、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄に弱い発現が見られた。また、腫瘍細胞株においてもHeLa S3、K562、SW480、A549に発現が認められ、特にHeLa S3においては非常に強く発現していることが明らかとなった。

[実施例4] 「ヒトOCTN2」のcDNAクローニング

「ヒトOCTN1」の全塩基配列を用いたデータベースサーチより、ヒト5番染色体q領域由来P1ファージクローン(P1 H24クローン。GenBank accession No.L43407, L43408, L46907, L81773, L43409)の塩基配列の一部に、「ヒトOCTN1」の配列と非常に類似した配列が含まれていることを見いだした。「ヒトOCTN1」の塩基配列と類似性がある部分は、全く類似性を持たない配列によって分断されているが、

これを「ヒトOCTN1」の配列を参考にすることにより連結してみると、「ヒトOCTN1」と広い領域に渡って高い相同性を持つ配列になることがわかった。このことから、「OCTN1」ホモログが存在することが示唆された。しかしデータベースに登録されているゲノム配列は全コーディング領域をカバーしていない不完全なものであったため、この配列からだけでは、そこにコードされるタンパク質の完全な構造を知ることは不可能であった。そこでこの「OCTN1」ホモログ遺伝子（「OCTN2」）のcDNAクローニングを行い、コードされるタンパクの構造を決定した。まず、これらのP1ファージクローンの配列より631R S4プライマー（5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTC-3' / 配列番号：13）及び631R A1プライマー（5'-AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG-3' / 配列番号：14）を作製し、ヒト成人腎臓由来polyA⁺ RNA（CLONTECH社製）より合成したcDNAを鋳型に、94°Cで3分、「94°Cで30秒、58°Cで1分、72°Cで2分」を35サイクル、72°Cで10分という条件によるPCRを行ったところ、約900bpの断片が増幅された。この断片をpT7Blue-Tベクター（Novagen社製）にTAクローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を決定したところ、全体に渡り「ヒトOCTN1」と非常に高い相同性を有することが明らかとなった。そこでこの遺伝子を「ヒトOCTN2」と命名し、さらに長いcDNAのクローニングを行った。

このクローンのインサートをプローブとして用い、「ヒトOCTN1」cDNAクローニングの場合と同様な方法でヒト腎臓由来cDNAライブラリーをスクリーニングし、より長いクローンを単離していく操作、及びRACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法（Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995) CLONTECHniques X, 5-8）等により、「ヒトOCTN2」の全コーディング領域を含むcDNAをクローニングしその構造を決定した（配列番号：4）。RACE法は具体的には、次のように行った。631R S6プライマー（5'-AGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTT-3' / 配列番号：15）を作製し、ヒト成人腎臓由来Marathon-Ready™ cDNA（CLONTECH社製）を鋳型として、94°Cで2分、「94°Cで30秒、60°Cで1分、72°Cで3分」を35サイクル、72°Cで10分という条件のPCRを行ったところ、約1.7kbpの3'側cDNA断片が増幅され、これ

をpT7Blue-TベクターにTAクローニング法によりサブクローニングし、構造を決定した。

「ヒトOCTN2」は557アミノ酸からなるORFをコードしていることが明らかとなった。「ヒトOCTN1」と「ヒトOCTN2」のアミノ酸配列の比較を図3に示す。両者は全体に渡り、約76%という非常に高い相同性を示した。また「ヒトOCTN2」アミノ酸配列中には「ヒトOCTN1」と同様に1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列(160-176)が存在した。これらのことより、「OCTN2」は「OCTN1」と構造上の関連を持った新規トランスポーターである可能性が示唆された。また、「ヒトOCTN2」アミノ酸配列中にも、「ヒトOCTN1」と同様にATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列(218-225)が存在した。

〔実施例5〕 ノーザン解析

631R S4プライマー(5'-GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTC-3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5'-AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG-3' / 配列番号: 14)を用いたPCRによって得られた約900bpの「ヒトOCTN2」cDNAをプローブとし、「ヒトOCTN1」と同様にノーザン解析を行った。その結果を図4に示す。発現パターンは「ヒトOCTN1」のパターンと重複している部分があるが、胎児組織において腎臓に非常に強い発現が見られる点が特に異なっていた。また、「ヒトOCTN2」もまたK-562, HeLaS3, SW480等の癌細胞株で強く発現していることが判明した。これらの癌細胞において、「OCTN1」、「OCTN2」が抗癌剤などの物質の輸送に関与している可能性が示唆される。

〔実施例6〕 「ヒトOCTN1」のヒト胎児腎臓細胞(HEK293)での強制発現と活性測定

ブラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングによって得られた陽性ファージクローンより、QIAGEN Lambda Kit(QIAGEN社製)を用いてファージDNAを抽出した。インサートDNAをpUC18ベクターにサブクローニングした後、SmaI及びEcoRIで切り出される全ORFを含むcDNAを、哺乳類細胞用の発現ベクターであるpc

DNA3(Invitrogen社製)のEcoRIサイトと、平滑末端化したHindIIIサイトとの間へ組み込み、発現用プラスミドDNA、「pcDNA3/OCTN1」を得た。プラスミドDNAは、QIAGEN PLASMID MAXI Kit(QIAGEN社製)を用いたアルカリ-SDS法で調製した。

pcDNA3/OCTN1、及びコントロールとしてインサートを含まないpcDNA3ベクターを、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞に導入した。すなわち、プラスミドDNA10 μ g、Hepes緩衝液(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 6mM Dextrose, 21mM Hepes pH7.1)1ml、2M CaCl₂ 62.5 μ lを混合し、30分以上室温で静置することによりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cmプレート1枚あたり1.5 x 10⁶個の細胞を蒔き、24時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え24時間培養し、その後PBS(Phosphate buffered saline)でプレートを洗浄し、培地を加えさらに24時間培養した。

プラスミドDNAを導入した細胞、あるいは未処理の細胞を用いて以下の手順に従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液(125mM NaCl, 4.8mM KCl, 5.6mM (+)-glucose, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 25mM Hepes pH7.4)に懸濁し、20分間ブレインキュベーションを行った。ついで各種基質のラベル体([¹⁴C]TEA<テトラエチルアンモニウム>(NEN)、[³H]カルニチン<L-カルニチン ヒドロクロリド>(Amersham社製)、[³H]PCG<ベンジルペニシリン>(Amersham)、[³H]キニジン(ARC)、[³H]ピリラミン<メピラミン>(Amersham社製))を適当量添加し、37°Cにて一定時間インキュベートを行った。これを、3M KCl層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物(比重=1.022)を重層して作製したシリコンレイヤー上に重層し、遠心することにより細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なお、この際、1 x 10⁶個の細胞を1ポイントとして用いた。また、HEK293細胞の培養は、ダルベッコMEM, 10% FCS(ウシ胎児血清)を培地とし、5%二酸化炭素中、37°Cで行った。

まず、TEAを基質として用い、pcDNA3/OCTN1を導入した細胞と、未処理の細胞に

におけるトランスポーター能を測定した（図5）。その結果、反応時間に依存した明らかな「ヒトOCTN1」導入細胞内へのTEAの取り込みが観察された。この取り込みは、未処理細胞においては見られなかった。次に、この系にラベル体ではないTEAを添加することによるコールドインヒビションの実験を行った（図6）。加えるコールドのTEAの濃度に応じて明らかな見かけ上の取り込みの低下が観察された。この実験においてはインサートを含まないpcDNA3ベクターを導入した細胞(Mock)をコントロールとしたが、未処理の細胞を用いた場合と同様に、ほとんど細胞内への基質の取り込みは認められず、この取り込み現象が「ヒトOCTN1」を導入したことによることが明らかとなった。次に、「ヒトOCTN1」のTEAに対する K_m （ミカエリス定数）値を求めるために、様々な濃度の $[^3H]$ TEAを加えた場合の取り込み量を測定した（図7）。「ヒトOCTN1」を導入した細胞における取り込み量からMockの取り込み量を差し引いた正味の取り込み量をLineweaver-Burk逆数プロットすることにより、 K_m 値は $0.44 \pm 0.04 \text{ mM}$ であることが求められた。また反応の最大速度 V_{max} は $6.68 \pm 0.34 (\text{nmol}/3 \text{ min}/\text{mg})$ であることが求められた。次に、TEA以外の物質に対する輸送能を検討した（図8）。有機カチオンであるカルニチン、キニジン、ピリラミンのラベル体を用い輸送能を測定したところ、Mockに対し明らかに有意な取り込み量の増加が観察され、これらの有機カチオンは「ヒトOCTN1」の基質になりうるということが明らかとなった。しかし、有機アニオンであるPCG(ベンジルペニシリン)に対しては取り込み量の有意な増加は認められなかった。

【実施例7】 *Xenopus*卵母細胞を用いた「ヒトOCTN1」の活性測定

pcDNA3/OCTN1を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼによりcRNAをin vitroで合成した。これを $0.3 \text{ ng}/\text{nl}$ に希釈し、 50 nl (15 ng)を一つの卵母細胞にインジェクションした。対照としては、蒸留水 50 nl をインジェクションした。この卵母細胞を3日間培養し、トランスポート実験に用いた。アップテイク緩衝液(0.05% Tween 80, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes pH 7.4)中、 25°C で20分卵母細胞をブレインキュベートした後、 0.5 ml のラベル体を含むアップテイク緩衝

液中に移し、取り込みを開始した。25°C、1時間インキュベートした後、氷冷したアップテイク緩衝液で3回洗浄することにより反応を止めた。5% SDSで卵母細胞を可溶化した後、クリアソルI（液体シンチレーションカウンター用カクテル）3mlと混合し、放射活性を測定した。また、インキュベーション時のラベル体を含んだアップテイク緩衝液（外部液）10 μ lの放射活性も同様に測定した。卵母細胞中の放射活性(dpm値)と、外部液中の放射活性(dpm値)の比を取り込み活性とした。

Xenopus卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果、この系においても「ヒトOCTN1」はTEAの輸送能を示すことが明らかとなった（図9）。また、TEA以外にもキニジン、メヒラミン、カルニチンといった有機カチオンを輸送する能力があることが判明した。

次に、抗癌剤などに対する輸送能を検討した。その結果、「ヒトOCTN1」はアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンを輸送する活性があることが明らかとなった（図10）。これらは実際に臨床において抗癌剤として使用されている薬剤であるが、これらの薬剤の細胞内への移行メカニズム（細胞への吸収メカニズム）において「OCTN1」が関与している可能性があることが強く示唆される。このことから、「OCTN1」により認識されやすいといった、このトランスポーターの基質特異性を利用した薬剤を設計、スクリーニングすることにより、より細胞内への吸収性が高い、有用な薬剤を効率よく開発することが可能になると考えられる。

〔実施例8〕 「ヒトOCTN2」のHEK細胞での強制発現と活性測定

「ヒトOCTN2」の哺乳類細胞における発現用プラスミドDNAは以下のようにして作製した

。ヒト胎児腎臓由来polyA⁺ RNA(CLONTECH社製)より、SuperScript™ II(GIBCO BRL社製)逆転写酵素を用い、一本鎖cDNAを合成した。これを鋳型とし、以下の条件でPCRを行い、それぞれ「ヒトOCTN2」の5'側断片、及び3'側断片を増幅した。

「ヒトOCTN2」の5'側断片（約800bp）の増幅には、OCN2 3プライマー(5'-GATG

GATCCCGGACGGTCTTGGGTCGCCTGCTG-3' / 配列番号：16) および OCN2 4プライマー (5'-GATGGATCCAAATGCTGCCACATAGTTGGAGAT-3' / 配列番号：17) を用いた。DNAポリメラーゼ-ExTaq (TaKaRa) および dNTP として「150 μ M 7-deaza dGTP, 50 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, 200 μ M dCTP」を用い、94°Cで2分、「94°Cで30秒、63 °Cで1分、72°Cで2分」を35サイクル、72°Cで10分の条件でPCRを行った。また、「ヒト OCN2」3' 側断片 (約1.2kbp) の増幅には、OCN2 7プライマー (5'-GATGGATCCATGGGCATGCAGACAGGCTTCAGC-3' / 配列番号：18) および OCN2 8プライマー (5'-GATGGATCCTTCCTCTTCAGTTTCTCCCTTACT-3' / 配列番号：19) を用いた。DNAポリメラーゼ-ExTaq (TaKaRa社製) および dNTP として「200 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, 200 μ M dCTP」を用い、94°Cで2分、「94°Cで30秒、63°Cで30秒、72°Cで2分」を35サイクル、72°Cで10分の条件でPCRを行った。

これらの断片をアガロースゲル電気泳動後にゲルから切り出して精製し、それぞれ pT7Blue-Tベクターにサブクローニングした。シーケンシングすることにより PCRエラーのないクローンを選び、両クローンを、重複する領域に存在する Pst I サイトによって連結した。これを最終的に pcDNA3ベクターの BamHI サイトに組み込み、発現用プラスミド DNA「pcDNA3/OCN2」とした。

pcDNA3/OCN2を、インサートを含まない pcDNA3ベクター (Mock) 及び pcDNA3/OCN1と共に実施例6で示した方法により HEK細胞に導入し、トランスポート実験を行った。その結果、「ヒト OCN2」はカルニチンを非常に効率よく輸送する活性を持つことが判明した (図11)。一方「ヒト OCN2」は、「ヒト OCN1」が効率よく輸送する TEA をほとんど輸送せず、両者には明らかな基質特異性があることが明らかとなった。

次にトランスポート緩衝液中の Na イオンを K に変更した緩衝液を用い、「ヒト OCN2」のカルニチン輸送における Na 依存性を調べた (図12)。その結果、「ヒト OCN2」のカルニチンの輸送は完全に Na の存在に依存していることが明らかとなった。このことから、「OCN2」は Na と基質を共輸送するタイプのトランスポーター

一であることが示唆された。

〔実施例 9〕 「マウスOCTN1」のクローニング

「ヒトOCTN1」cDNA配列を用いデータベースサーチを行ったところ、これと非常に高い相同性を有するいくつかのマウス由来EST(Expressed Sequence Tags)が見いだされた。これらのESTの配列からMONL 1プライマー(5'-CGCGCCGAATCGCTGAATCCTTTC-3' / 配列番号: 20)およびMONA 4プライマー(5'-AGGCTTTTGATTTGTTCTGTTGAG-3' / 配列番号: 21)を作製し、マウス腎臓由来polyA⁺ RNAより作製したcDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、約2kbpの断片が増幅され、これをアガロース電気泳動後切り出して精製し、pT7Blue Tベクター(Novagen社製)にTA cloning法によってサブクローニングした。複数のクローンをシーケンシングし、「マウスOCTN1」の配列を決定した。決定したcDNAの塩基配列を配列番号: 23に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 22に示す。

〔実施例 10〕 「マウスOCTN2」のクローニング

まず、「ヒトOCTN2」cDNAの配列よりMONB 20プライマー (5'-CCCATGCCAACAAGGACAAAAAGC-3' / 配列番号: 24) を作製し、マウス腎臓由来Marathon-Ready[™] cDNA (CLONTECH社製)を鋳型とした5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)により、このプライマーより5'側上流をクローニングした。次に、「ヒトOCTN2」配列を用いデータベースサーチをすることにより、これと非常に高い相同性を有するマウス由来ESTをいくつか見だし、これらのESTの配列からMONB 26プライマー (5'-ACAGAACAGAAAAGCCCTCAGTCA-3' / 配列番号: 25) を作製した。5'-RACEによって得られた配列からMONB 6プライマー(5'-TGTTTTTCGTGGGTGTGCTGATGG-3' / 配列番号: 26) を作製し、これとMONB 26プライマーを用いたPCRにより、3'側断片をマウス腎臓由来polyA⁺ RNAより作製したcDNAより増幅した。それぞれの断片をサブクローニングした後、あるいは直接にシーケンシングすることにより「マウスOCTN2」の配列を決定した。決定したcDNAの塩基配列を配列番号: 28に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 27に示す。

〔実施例 1 1〕 「マウスOCTN1」および「マウスOCTN1」の組織発現解析

「マウスOCTN1」および「マウスOCTN2」遺伝子の各組織における発現量をマウスMTC(Multiple Tissue cDNA)パネル (CLONTECH社製) を用いたRT-PCR法により調べた (図 1 3)。用いたプライマーは、「マウスOCTN1」については「MONL 1」および「MONA 4」、「マウスOCTN2」については「MONB 6」および「MONB 26」である。その結果、「マウスOCTN1」は腎臓や肝臓に、「マウスOCTN2」は腎臓、肝臓および 7 日目の胚に高い発現が認められた。

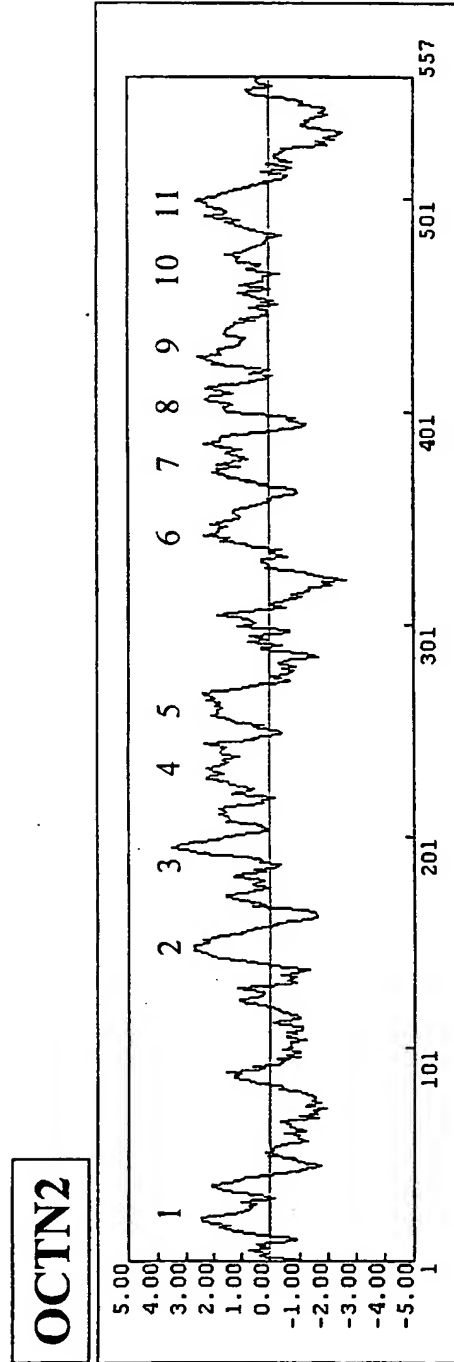
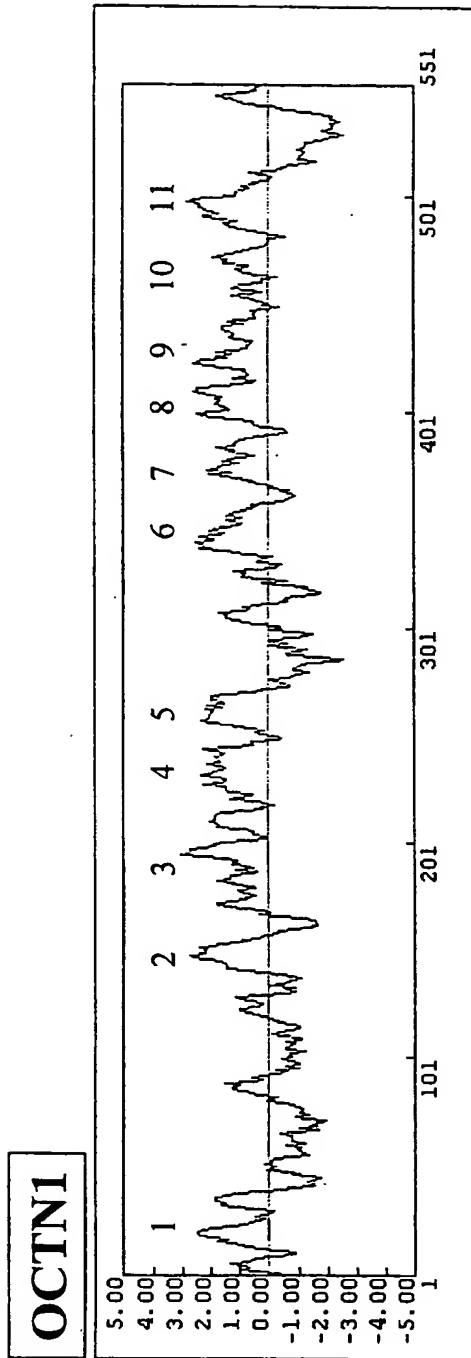
産業上の利用の可能性

本発明により、有機カチオンを輸送する新規なトランスポーター遺伝子ファミリーおよびこれら遺伝子がコードするタンパク質が提供された。本発明のトランスポータータンパク質は、これを介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や、その機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発などに有用である。

請求の範囲

1. 配列番号：1、3、22若しくは27に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはこれらタンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。
2. 配列番号：2、4、23若しくは28に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。
3. 請求項1または2に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 請求項3に記載のDNAが挿入されたベクター。
5. 請求項3に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
6. 請求項5に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1または2に記載のタンパク質の製造方法。
7. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する抗体。
8. 配列番号：2、4、23若しくは28に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA。

1



2 / 1 3

図 2

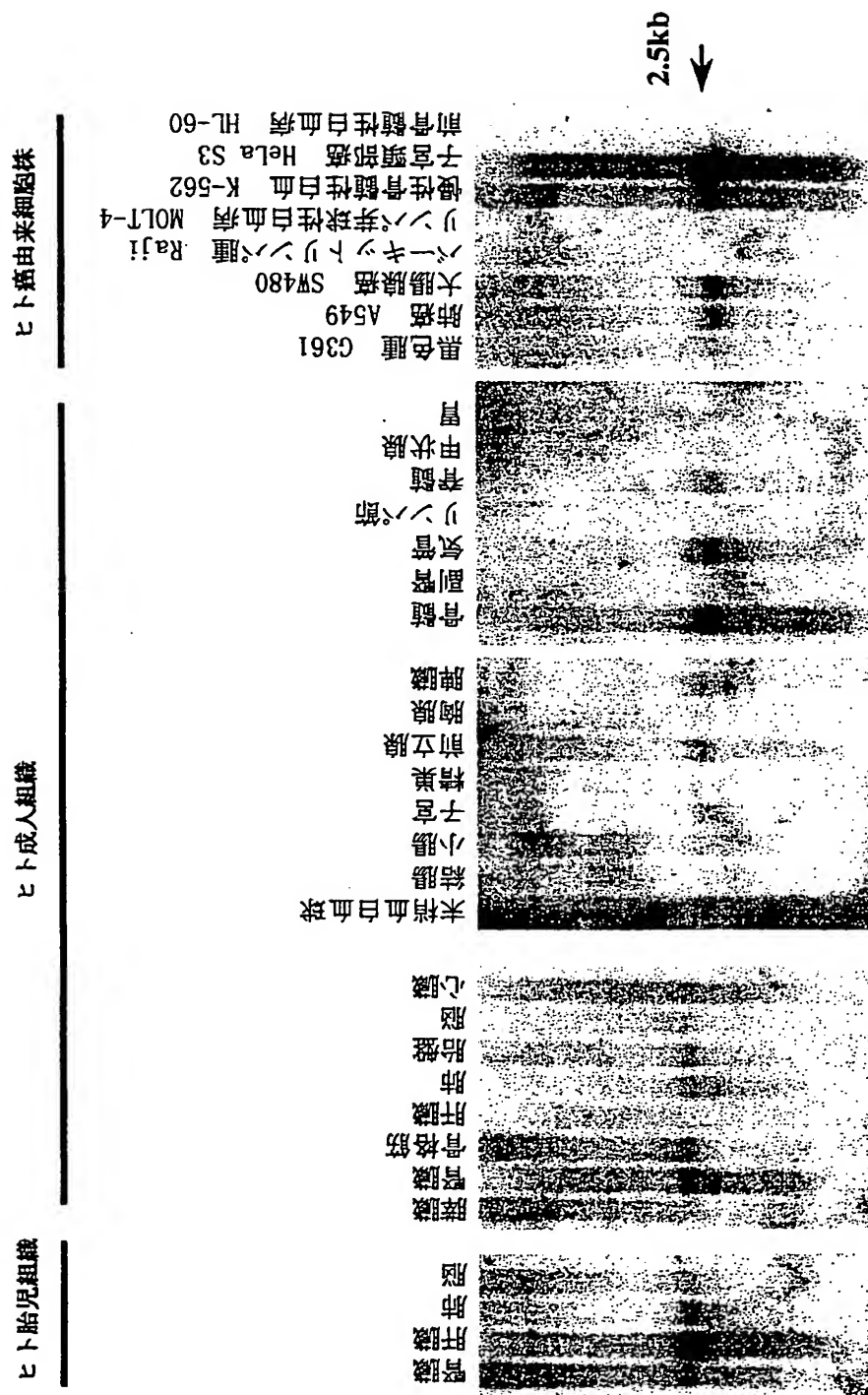
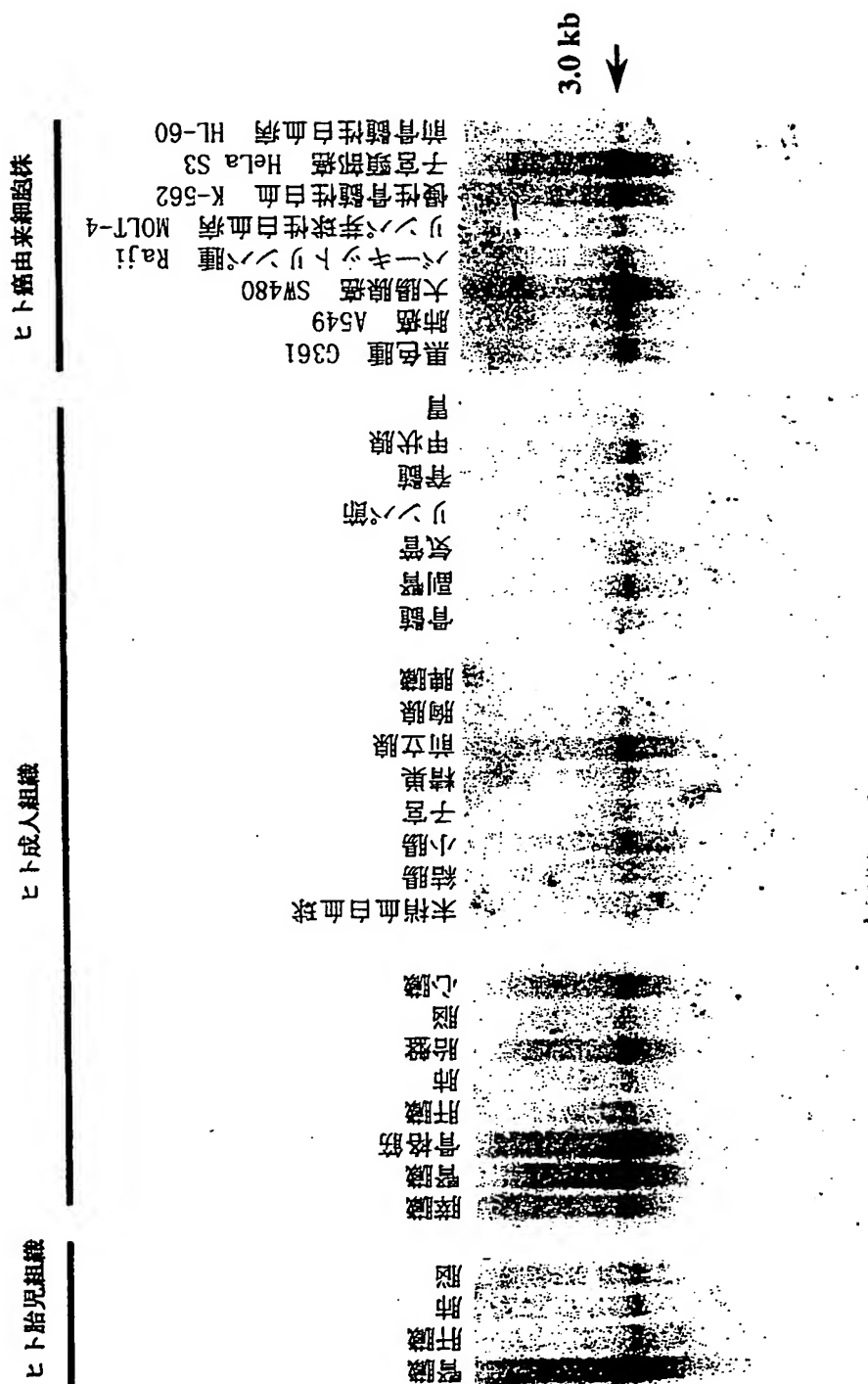
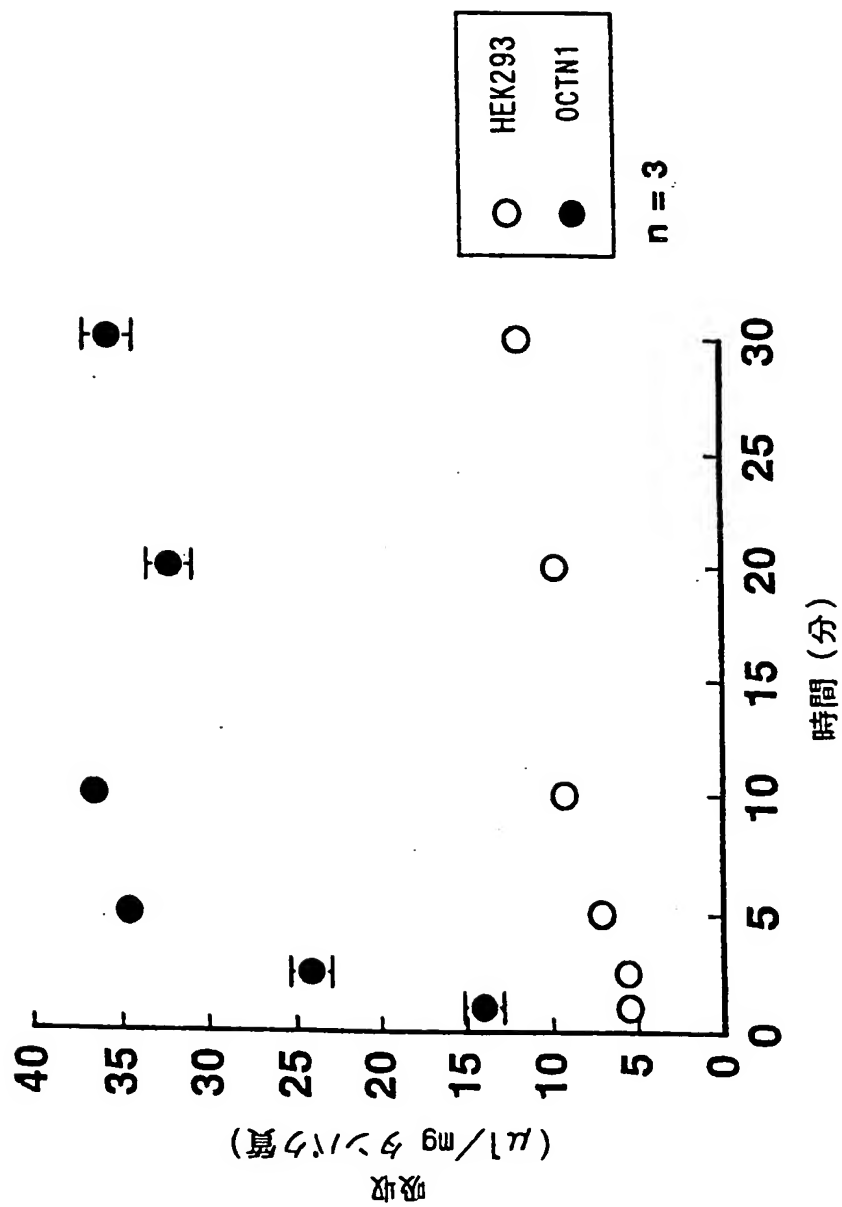


図 4



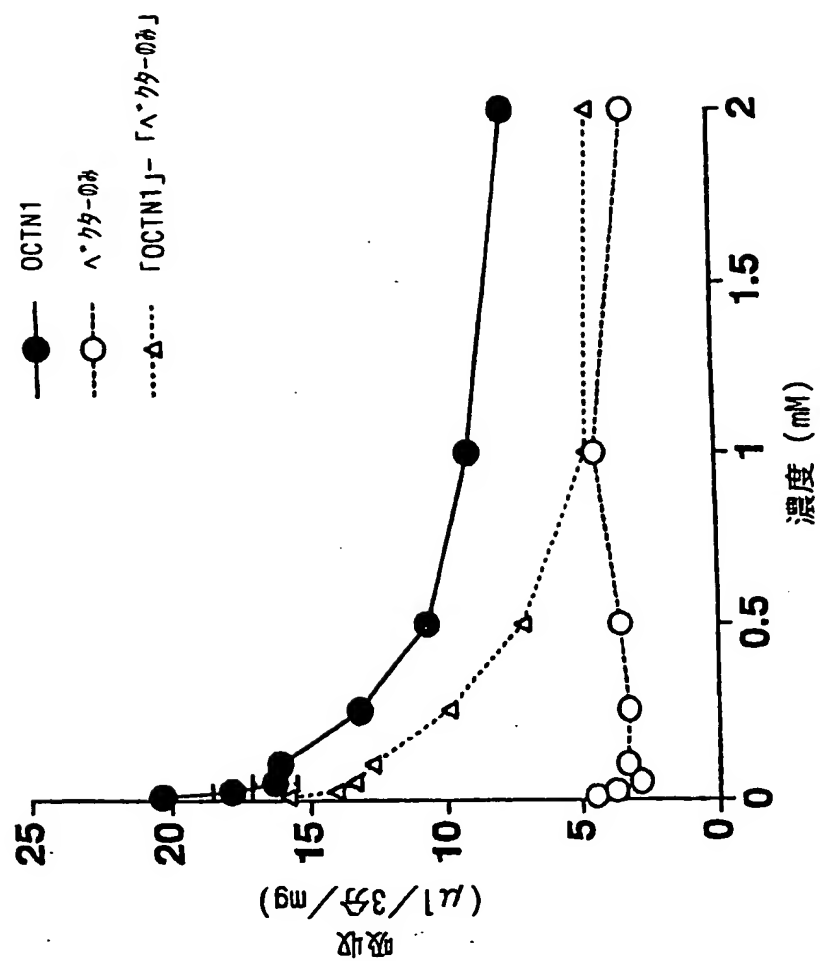
5 / 13

図 5



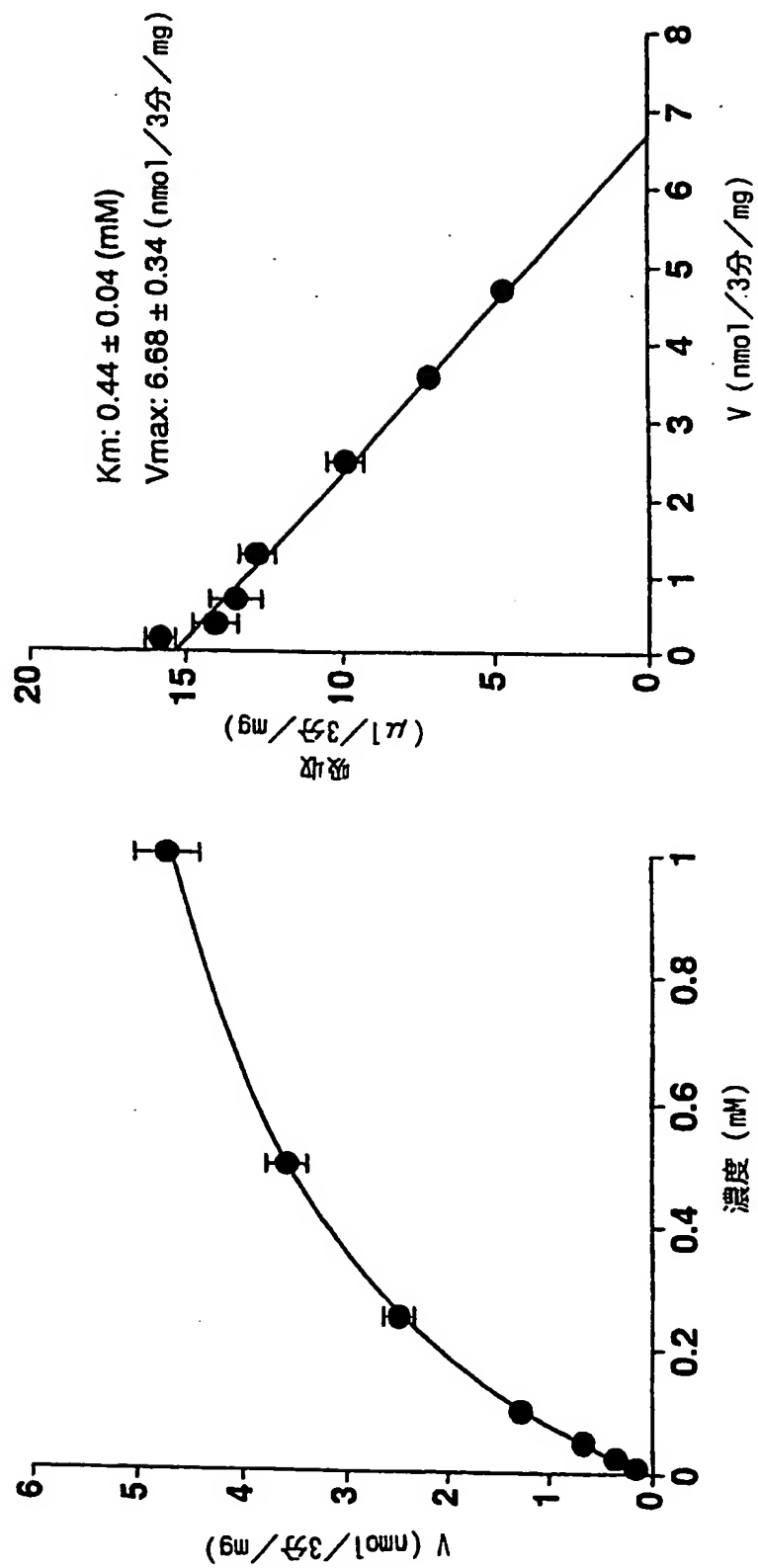
6 / 13

図 6



7 / 13

図 7



8 / 13

図 8

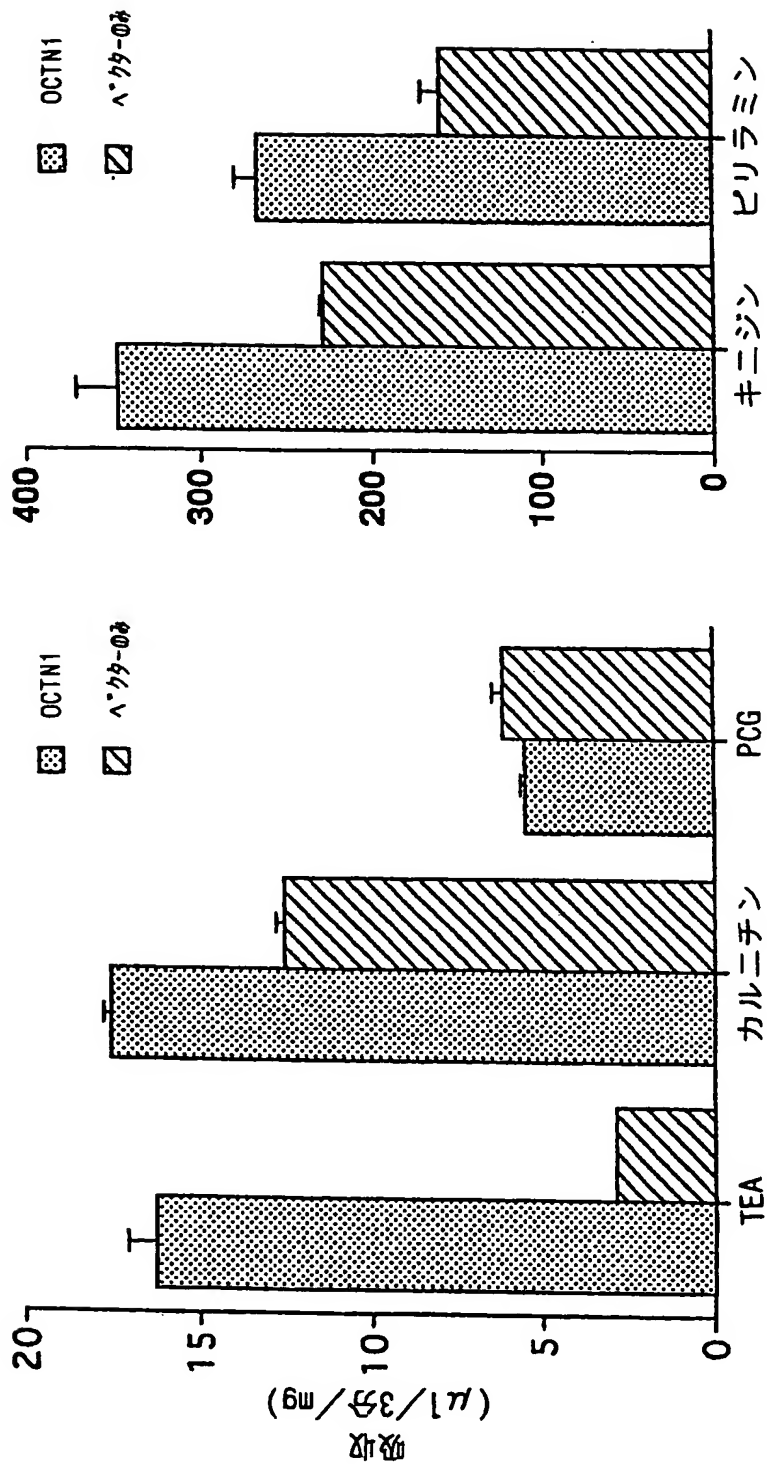
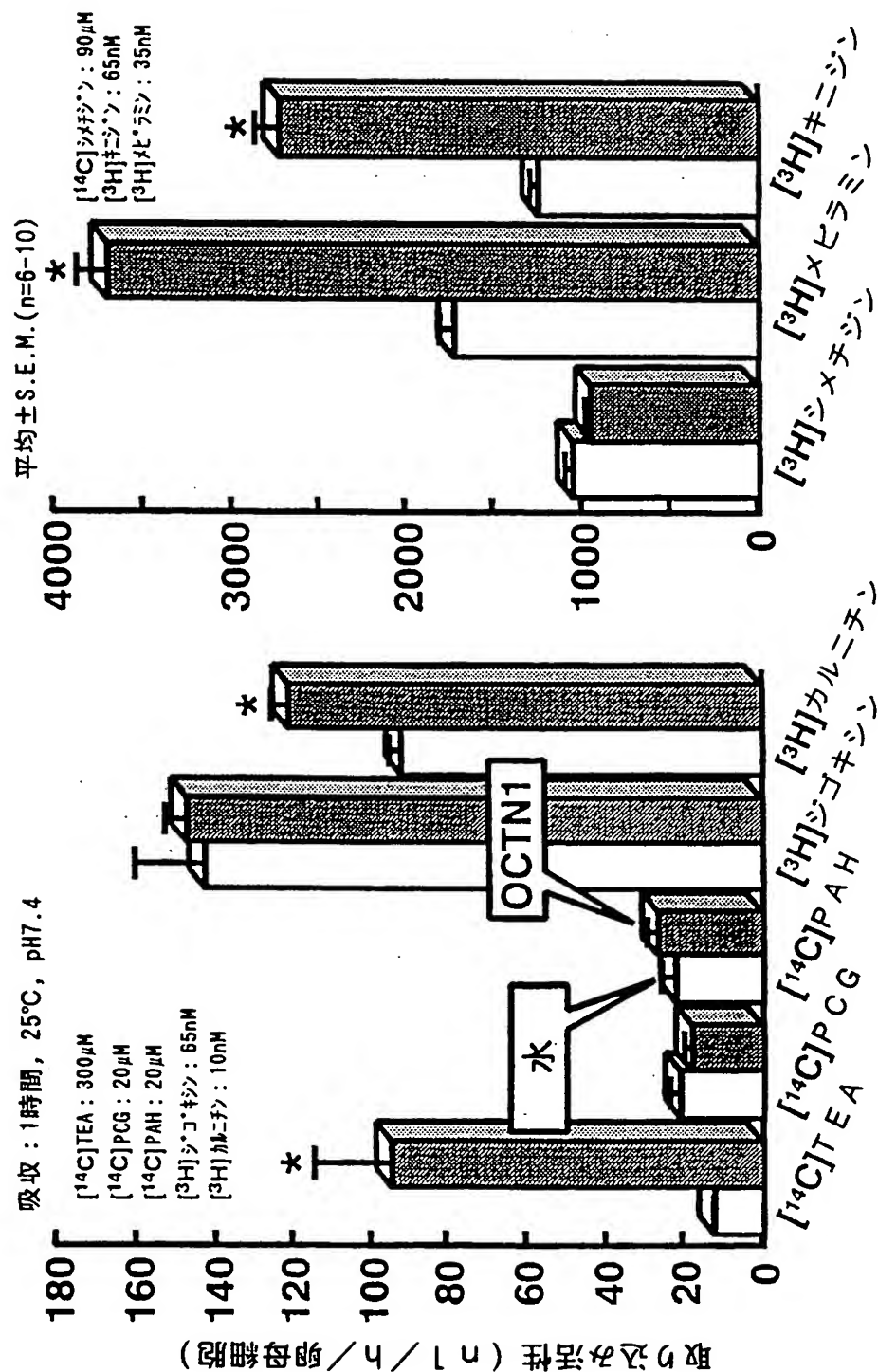


図 9



10/13

図 10

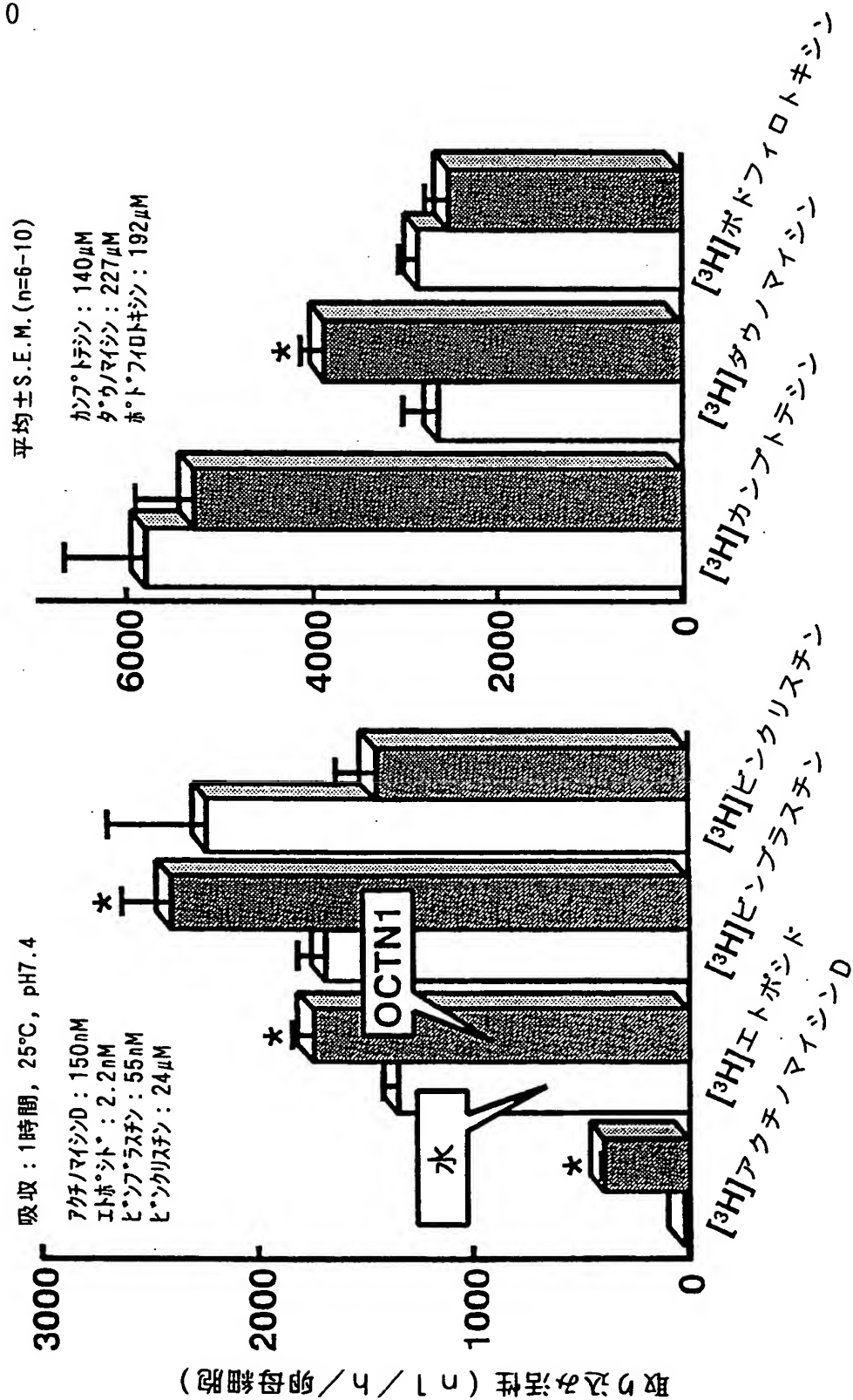
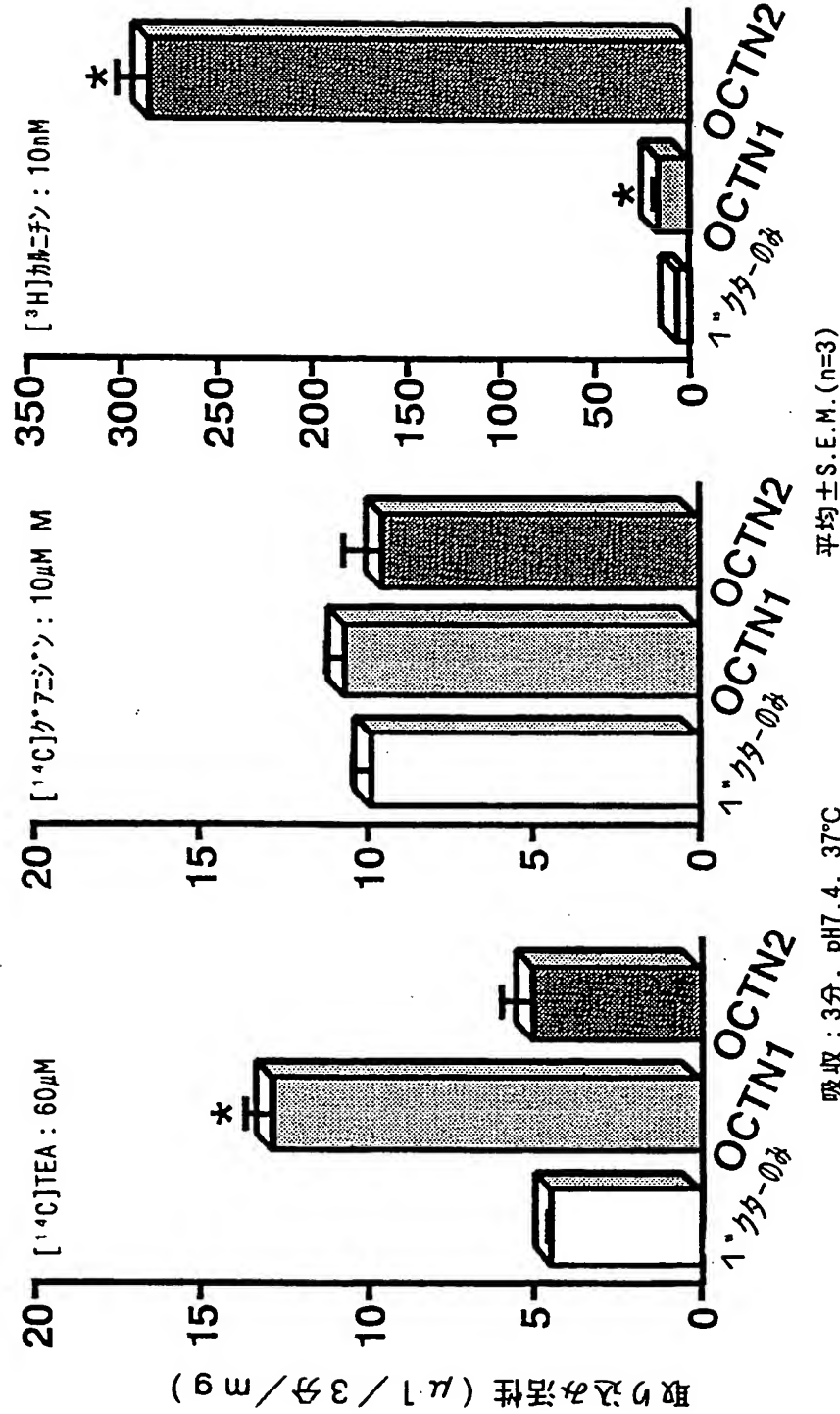


図 11



12/13

図12

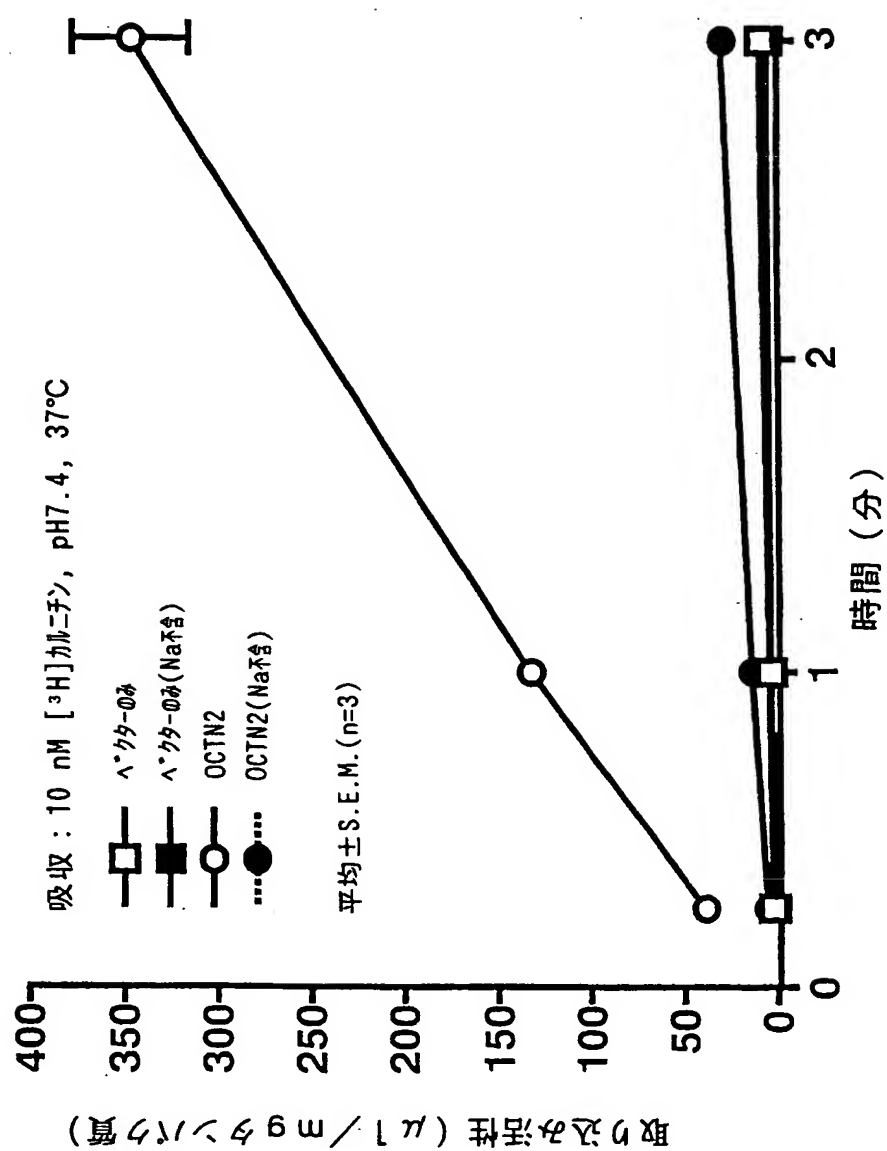
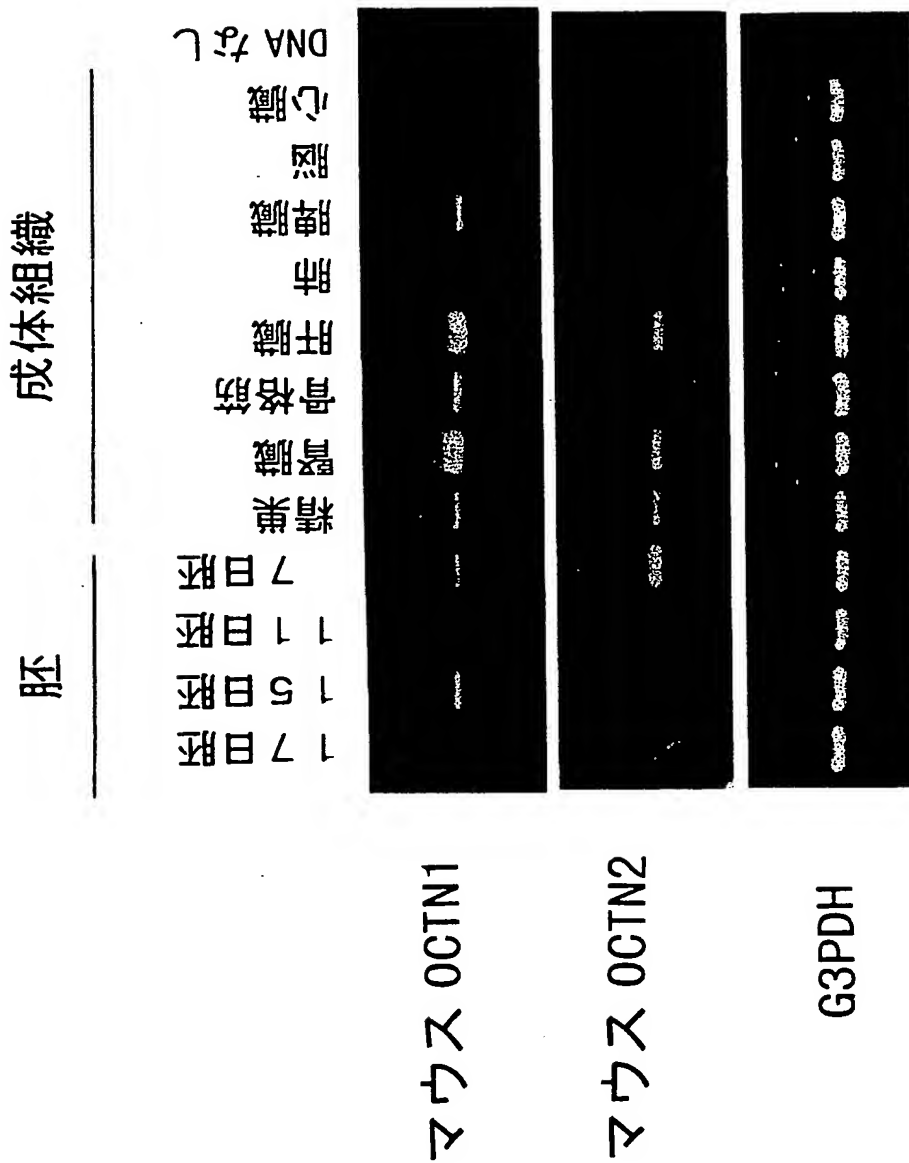


図 13



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社 中外分子医学研究所

<120> TRANSPORTER GENES

トランスポーター遺伝子

<130> C2-906DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 9-260972

JP 10-156660

<151> 1997-9-8

1998-5-20

<160> 28

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> Homo sapiens

2/52

<400> 1

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

1

5

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60

65

70

Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile

75

80

85

Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu

90

95

100

105

Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln

110

115

120

3/52

Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu

125

130

135

Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val

140

145

150

Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg

155

160

165

Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe

170

175

180

185

Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val

190

195

200

Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu

205

210

215

Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu

220

225

230

Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe

235

240

245

Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val

250

255

260

265

4752

Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro

270

275

280

Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile

285

290

295

Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe

300

305

310

Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile

315

320

325

Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser

330

335

340

345

Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu

350

355

360

Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser

365

370

375

Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg

380

385

390

Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly

5/52

395	400	405	
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu			
410	415	420	425
Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe			
	430	435	440
Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg			
	445	450	455
Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile			
	460	465	470
Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro			
	475	480	485
Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu			
490	495	500	505
Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln			
	510	515	520
Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser			
	525	530	535

6/52

Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

540

545

550

<210> 2

<211> 2135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (147)..(1799)

<400> 2

ccccggcttc gcgcccgaat ttctaacagc ctgcctgtcc cccgggaacg ttctaacatc 60

cttggggagc gcccagcta caagacactg tcctgagaac gctgtcatca cccgtagttg 120

caagtttcgg agcggcagtg ggaagc atg cgg gac tac gac gag gtg atc gcc 173

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

1

5

ttc ctg ggc gag tgg ggg ccc ttc cag cgc etc atc ttc ttc ctg etc 221

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

agc gcc agc atc atc ccc aat ggc ttc aat ggt atg tca gtc gtg ttc 269

7/52

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

ctg gcg ggg acc ccg gag cac cgc tgt cga gtg ccg gac gcc gcg aac 317

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

ctg agc agc gcc tgg cgc aac aac agt gtc ccg ctg cgg ctg cgg gac 365

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60

65

70

ggc cgc gag gtg ccc cac agc tgc agc cgc tac cgg ctc gcc acc atc 413

Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile

75

80

85

gcc aac ttc tcg gcg ctc ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg 461

Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu

90

95

100

105

ggg cag ctg gag cag gag agc tgc ctg gat ggc tgg gag ttc agc cag 509

Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln

110

115

120

gac gtc tac ctg tcc acc gtc gtg acc gag tgg aat ctg gtg tgt gag 557

Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu

125

130

135

8/52

gac aac tgg aag gtg ccc ctc acc acc tcc ctg ttc ttc gta ggc gtg 605
 Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val
 140 145 150

ctc ctc ggc tcc ttc gtg tcc ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc agg 653
 Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg
 155 160 165

aag aac gtt ctc ttc gca acc atg gct gta cag act ggc ttc agc ttc 701
 Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe
 170 175 180 185

ctg cag att ttc tcc atc agc tgg gag atg ttc act gtg tta ttt gtc 749
 Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val
 190 195 200

atc gtg ggc atg ggc cag atc tcc aac tat gtg gta gcc ttc ata cta 797
 Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu
 205 210 215

gga aca gaa att ctt ggc aag tca gtt cgt att ata ttc tct aca tta 845
 Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu
 220 225 230

gga gtg tgc aca ttt ttt gca gtt ggc tat atg ctg ctg cca ctg ttt 893

9/52

Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe

235

240

245

gct tac ttc atc aga gac tgg cgg atg ctg ctg ctg gcg ctg acg gtg 941

Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val

250

255

260

265

ccg gga gtg ctg tgt gtc ccg ctg tgg tgg ttc att cct gaa tct ccc 989

Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro

270

275

280

cga tgg ctg ata tcc cag aga aga ttt aga gag gct gaa gat atc atc 1037

Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile

285

290

295

caa aaa gct gca aaa atg aac aac aca gct gta cca gca gtg ata ttt 1085

Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe

300

305

310

gat tct gtg gag gag cta aat ccc ctg aag cag cag aaa gct ttc att 1133

Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile

315

320

325

ctg gac ctg ttc agg act cgg aat att gcc ata atg acc att atg tct 1181

Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser

330

335

340

345

10/52

ttg ctg cta tgg atg ctg acc tca gtg ggt tac ttt gct ctg tct ctg 1229
 Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu
 350 355 360

gat gct cct aat tta cat gga gat gcc tac ctg aac tgt ttc ctc tct 1277
 Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser
 365 370 375

gcc ttg att gaa att cca gct tac att aca gcc tgg ctg cta ttg cga 1325
 Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg
 380 385 390

acg ctg ccc agg cgt tat atc ata gct gca gta ctg ttc tgg gga gga 1373
 Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly
 395 400 405

ggt gtg ctt ctc ttc att caa ctg gta cct gtg gat tat tac ttc tta 1421
 Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu
 410 415 420 425

tcc att ggt ctg gtc atg ctg gga aaa ttt ggg atc acc tct gct ttc 1469
 Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe
 430 435 440

tcc atg ctg tat gtc ttc act gct gag ctc tac cca acc ctg gtc agg 1517

11/52

Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg

445

450

455

aac atg gcg gtg ggg gtc aca tcc acg gcc tcc aga gtg ggc agc atc 1565

Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile

460

465

470

att gcc ccc tac ttt gtt tac ctc ggt gct tac aac aga atg ctg ccc 1613

Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro

475

480

485

tac atc gtc atg ggt agt ctg act gtc ctg att gga atc ttc acc ctt 1661

Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu

490

495

500

505

ttt ttc cct gaa agt ttg gga atg act ctt cca gaa acc tta gag cag 1709

Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln

510

515

520

atg cag aaa gtg aaa tgg ttc aga tct ggg aaa aaa aca aga gac tca 1757

Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser

525

530

535

atg gag aca gaa gaa aat ccc aag gtt cta ata act gca ttc 1799

Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

540

545

550

12/52

tgaaaaaata tctaccccat ttggtgaagt gaaaaacaga aaaataagac cctgtggaga 1859

aattcgttgt tcccactgaa atggactgac tgtaacgatt gacaccaaaa tgaaccttgc 1919

tatcaagaaa tgctcgatcat acagtaaact ctggatgatt cttccagata atgtccttgc 1979

tttacaacc aaccatttct agagagtctc cttactcatt aattcaatga aatggattgg 2039

taagatgtct tgaaaacatg ttagtcaagg actggtaaaa tacatataaa gattaacact 2099

catttccaat catacaaata ctatccaaat aaaaat 2135

<210> 3

<211> 557

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1 5 10 15

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20 25 30

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

13/52

35	40	45
His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg		
50	55	60
Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His		
65	70	75
Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu		
80	85	90
95		
Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu		
100	105	110
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr		
115	120	125
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro		
130	135	140
Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile		
145	150	155
Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val		
160	165	170
175		

14/52

Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys

180

185

190

Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln

195

200

205

Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly

210

215

220

Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr

225

230

235

Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp

240

245

250

255

Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val

260

265

270

Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln

275

280

285

Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala

290

295

300

Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln

305

310

315

15/52

Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu

320 325 330 335

Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp

340 345 350

Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn

355 360 365

Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu

370 375 380

Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg

385 390 395

Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu

400 405 410 415

Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu

420 425 430

Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr

435 440 445

Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val

16/52

450

455

460

Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr

465

470

475

Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met

480

485

490

495

Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu

500

505

510

Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val

515

520

525

Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys

530

535

540

Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 4

<211> 1831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

17/52

<221> CDS

<222> (124)..(1794)

<400> 4

cggacggtct tgggtgcct gctgcctggc ttgcctggc ggcgcggggt gccccgcgcg 60

cacgcgcaaa gccccgcgcg ttcccagacc ccaggccgcg ctctgtgggc ctctgagggc 120

ggc atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg 168

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1 5 10 15

ccc ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc 216

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20 25 30

aat ggc ttc acc ggc ctg tcc tcc gtg ttc ctg ata gcg acc ccg gag 264

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

35 40 45

cac cgc tgc cgg gtg ccg gac gcc gcg aac ctg agc agc gcc tgg cgc 312

His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg

50 55 60

aac cac act gtc cca ctg cgg ctg cgg gac gcc cgc gag gtg ccc cac 360

Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His

18/52

65	70	75	
agc tgc cgc cgc tac cgg ctc gcc acc atc gcc aac ttc tgc gcg ctc Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu			408
80	85	90	95
ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg ggg cag ctg gag cag gag Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu			456
100	105	110	
agc tgt ctg gat ggc tgg gag ttc agt cag gac gtc tac ctg tcc acc Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr			504
115	120	125	
att gtg acc gag tgg aac ctg gtg tgt gag gac gac tgg aag gcc cca Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro			552
130	135	140	
ctc aca atc tcc ttg ttc ttc gtg ggt gtg ctg ttg ggc tcc ttc att Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile			600
145	150	155	
tca ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc cgg aag aat gtg ctg ttc gtg Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val			648
160	165	170	175

19/52

acc atg ggc atg cag aca ggc ttc agc ttc ctg cag atc ttc tcg aag 696

Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys

180

185

190

aat ttt gag atg ttt gtc gtg ctg ttt gtc ctt gta ggc atg ggc cag 744

Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln

195

200

205

atc tcc aac tat gtg gca gca ttt gtc ctg ggg aca gaa att ctt ggc 792

Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly

210

215

220

aag tca gtt cgt ata ata ttc tct acg tta gga gtg tgc ata ttt tat 840

Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr

225

230

235

gca ttt ggc tac atg gtg ctg cca ctg ttt gct tac ttc atc cga gac 888

Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp

240

245

250

255

tgg cgg atg ctg ctg gtg gcg ctg acg atg ccg ggg gtg ctg tgc gtg 936

Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val

260

265

270

gca ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc ccc cga tgg ctc atc tct cag 984

Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln

20/52

275	280	285	
gga cga ttt gaa gag gca gag gtg atc atc cgc aag gct gcc aaa gcc 1032			
Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala			
290	295	300	
aat ggg att gtt gtg cct tcc act atc ttt gac ccg agt gag tta caa 1080			
Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln			
305	310	315	
gac cta agt tcc aag aag cag cag tcc cac aac att ctg gat ctg ctt 1128			
Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu			
320	325	330	335
cga acc tgg aat atc cgg atg gtc acc atc atg tcc ata atg ctg tgg 1176			
Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp			
340	345	350	
atg acc ata tca gtg ggc tat ttt ggg ctt tcg ctt gat act cct aac 1224			
Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn			
355	360	365	
ttg cat ggg gac atc ttt gtg aac tgc ttc ctt tca gcg atg gtt gaa 1272			
Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu			
370	375	380	

21/52

gtc cca gca tat gtg ttg gcc tgg ctg ctg ctg caa tat ttg ccc cgg 1320

Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg

385

390

395

cgc tat tcc atg gcc act gcc ctc ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc 1368

Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu

400

405

410

415

ttc atg cag ctg gta ccc cca gac ttg tat tat ttg gct aca gtc ctg 1416

Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu

420

425

430

gtg atg gtg ggc aag ttt gga gtc acg gct gcc ttt tcc atg gtc tac 1464

Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr

435

440

445

gtg tac aca gcc gag ctg tat ccc aca gtg gtg aga aac atg ggt gtg 1512

Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val

450

455

460

gga gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctg ggc agc atc ctg tct ccc tac 1560

Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr

465

470

475

ttc gtt tac ctt ggt gcc tac gac cgc ttc ctg ccc tac att ctc atg 1608

Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met

22/52

480	485	490	495	
gga agt ctg acc atc ctg aca gcc atc ctc acc ttg ttt ctc cca gag				1656
Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu				
	500	505	510	
agc ttc ggt acc cca ctc cca gac acc att gac cag atg cta aga gtc				1704
Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val				
	515	520	525	
aaa gga atg aaa cac aga aaa act cca agt cac aca agg atg tta aaa				1752
Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys				
	530	535	540	
gat ggt caa gaa agg ccc aca atc ctt aaa agc aca gcc ttc				1794
Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe				
	545	550	555	
taacatcgct tccagtaagg gagaaactga agaggaa				1831

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

23/52

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 5

ctaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 6

tgtagcgtga agacgacaga a

21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

24/52

<400> 7

tcgagcggcc gcccgggcag gt

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 8

agggcgtggt gcggaggcgc gt

22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 9

25/52

cttttgagca agttcagcct

20

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 10

agaggtggct tatgagtatt tctt

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 11

ccagggtttt cccagtcacg ac

22

26/52

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 12

tcacacagga aacagctatg ac

22

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 13

gtgctgttgg gctccttcat ttca

24

<210> 14

<211> 24

27/52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 14

agctgcatga agagaaggac actg

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 15

agcatcctgt ctcctactt cgtt

24

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

28/52

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 16

gatggatccc ggaagggtctt gggtcgcctg ctg 33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 17

gatggatcca aatgctgcca catagttgga gat 33

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

29/52

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 18

gatggatcca tgggcatgca gacaggcttc agc 33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 19

gatggatcct tcctcttcag tttctccctt act 33

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer

30/52

Sequence

<400> 20

cgcgccgaat cgctgaatcc tttc

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 21

aggcttttga tttgttctgt tgag

24

<210> 22

<211> 553

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

31/52

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35

40

45

Arg Cys Leu Val Pro Asp Thr Val Asn Leu Ser Ser Ser Trp Arg Asn

50

55

60

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Ser

65

70

75

80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Met Gly

85

90

95

Leu Glu Pro Gly Gln Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Ile Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Thr Pro Leu

130

135

140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Cys Gly Ser Phe Val Ser

145

150

155

160

32/52

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Lys Val Leu Phe Ala Thr

165

170

175

Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe Val Gln Ile Phe Ser Thr Asn

180

185

190

Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala

225

230

235

240

Ile Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro Gly Leu Phe Cys Val Pro

260

265

270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg

275

280

285

Arg Phe Ala Glu Ala Glu Gln Ile Ile Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn

33/52

290	295	300	
Ser Ile Val Ala Pro Ala Gly Ile Phe Asp Pro Leu Glu Leu Gln Glu			
305	310	315	320
Leu Asn Ser Leu Lys Gln Gln Lys Val Ile Ile Leu Asp Leu Phe Arg			
	325	330	335
Thr Arg Asn Ile Ala Thr Ile Thr Val Met Ala Val Met Leu Trp Met			
	340	345	350
Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu Asn Val Pro Asn Leu			
	355	360	365
His Gly Asp Val Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser Gly Leu Ile Glu Val			
	370	375	380
Pro Ala Tyr Phe Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg Thr Leu Pro Arg Arg			
385	390	395	400
Tyr Ile Ile Ala Gly Val Leu Phe Trp Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu			
	405	410	415
Ile Gln Val Val Pro Glu Asp Tyr Asn Phe Val Ser Ile Gly Leu Val			
	420	425	430

34/52

Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe Ser Met Leu Tyr Val

435

440

445

Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg Asn Met Ala Val Gly

450

455

460

Ile Thr Ser Met Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile Ile Ala Pro Tyr Phe

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Leu Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Ile Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

Phe Gly Val Thr Leu Pro Glu Asn Leu Glu Gln Met Gln Lys Val Arg

515

520

525

Gly Phe Arg Cys Gly Lys Lys Ser Thr Val Ser Val Asp Arg Glu Glu

530

535

540

Ser Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

545

550

<210> 23

<211> 2083

35/52

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(1780)

<400> 23

attcggcaca ggacggcgtg tttagcagc cacctaggaa gatccctca gcgcgccgaa 60

tcgctgaatc ctttctctcc acccactcc ctcacgcaag ctgaggagga gaggtggaaa 120

c atg cgg gac tac gac gag gtg atc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg ccc 169

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1 5 10 15

ttc cag cgc ctc atc ttc ttt ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc aat 217

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20 25 30

ggc ttc aat ggt atg tca gtc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccc gag cac 265

Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35 40 45

cgt tgc ctg gtt cct gac act gtg aac ctg agc agc tcc tgg cgc aac 313

Arg Cys Leu Val Pro Asp Thr Val Asn Leu Ser Ser Ser Trp Arg Asn

50 55 60

36/52

cac agc atc ccc ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag agc	361
His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Ser	
65 70 75 80	
tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gcg atg ggg	409
Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Met Gly	
85 90 95	
ctg gag cca gga cag gac gtg gat ctg gag cag ctg gag cag gag agc	457
Leu Glu Pro Gly Gln Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser	
100 105 110	
tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac atc ttc ctg tcc acc atc	505
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Ile Phe Leu Ser Thr Ile	
115 120 125	
gtg aca gag tgg aat ctg gtg tgt gag gat gac tgg aag aca ccc ctc	553
Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Thr Pro Leu	
130 135 140	
acc acc tcc ctg ttc ttc gta ggc gtt ctc tgc ggc tcc ttc gtg tct	601
Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Cys Gly Ser Phe Val Ser	
145 150 155 160	
ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc agg aag aaa gtc ctc ttt gca acc	649

37/52

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Lys Val Leu Phe Ala Thr

165

170

175

atg gct gtg cag act gga ttc agc ttc gtg cag att ttc tca acc aac 697

Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe Val Gln Ile Phe Ser Thr Asn

180

185

190

tgg gag atg ttc act gtg ttg ttt gcc att gtg ggc atg ggc cag atc 745

Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

tcc aac tac gtg gtg gcc ttc ata cta gga act gaa atc ctg agc aag 793

Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

tcg gtt cgc atc atc ttc tcc aca tta gga gtc tgt aca ttt ttt gca 841

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala

225

230

235

240

atc ggc tac atg gtc ctg ccg ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg 889

Ile Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

agg atg ctg ctg ctg gcc ctg aca ctg cct ggc ctg ttc tgt gtt ccc 937

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Leu Pro Gly Leu Phe Cys Val Pro

260

265

270

38/52

ctg tgg tgg ttt att cca gaa tct ccc cgg tgg ctg ata tcc cag agg 985
 Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg
 275 280 285

aga ttt gca gag gcc gaa cag atc atc cag aaa gcc gca aag atg aac 1033
 Arg Phe Ala Glu Ala Glu Gln Ile Ile Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn
 290 295 300

agc atc gtg gcg cca gca ggg ata ttc gat cct cta gag cta cag gag 1081
 Ser Ile Val Ala Pro Ala Gly Ile Phe Asp Pro Leu Glu Leu Gln Glu
 305 310 315 320

cta aac tcc ttg aag cag cag aaa gtc ata atc ctg gac ctg ttc agg 1129
 Leu Asn Ser Leu Lys Gln Gln Lys Val Ile Ile Leu Asp Leu Phe Arg
 325 330 335

act cgg aac att gcc acc ata acc gtg atg gct gtg atg ctg tgg atg 1177
 Thr Arg Asn Ile Ala Thr Ile Thr Val Met Ala Val Met Leu Trp Met
 340 345 350

cta acc tca gtg ggt tac ttt gct ctg tct ctc aat gtt cct aat tta 1225
 Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu Asn Val Pro Asn Leu
 355 360 365

cat gga gat gtc tac ctg aac tgc ttc ctc tct ggc ctg att gaa gtt 1273

39/52

His Gly Asp Val Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser Gly Leu Ile Glu Val

370

375

380

cca gct tac ttc aca gcc tgg ctg cta ctg cga acc ctg cca cgg aga 1321

Pro Ala Tyr Phe Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg Thr Leu Pro Arg Arg

385

390

395

400

tat att ata gct ggg gtg cta ttc tgg gga gga ggt gtg ctt ctc ttg 1369

Tyr Ile Ile Ala Gly Val Leu Phe Trp Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu

405

410

415

atc caa gtg gta cct gaa gat tat aac ttt gtg tcc att gga ctg gtg 1417

Ile Gln Val Val Pro Glu Asp Tyr Asn Phe Val Ser Ile Gly Leu Val

420

425

430

atg ctg ggg aaa ttt ggg atc acc tct gcc ttc tcc atg ttg tat gtc 1465

Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe Ser Met Leu Tyr Val

435

440

445

ttc act gcg gag ctc tac cca acc ctg gtc agg aac atg gct gtg ggc 1513

Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg Asn Met Ala Val Gly

450

455

460

atc acc tcc atg gcc tct cgg gtg ggc agc atc att gcc ccc tat ttc 1561

Ile Thr Ser Met Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile Ile Ala Pro Tyr Phe

465

470

475

480

gtt tac ctg ggc gcc tat aac aga ctc cta ccc tac atc ctc atg ggc 1609
Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Leu Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly
485 490 495

agt ctg act gtc ctc att gga atc atc acg ctt ttt ttc cct gaa agt 1657
Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Ile Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser
500 505 510

ttt gga gtg act cta cca gag aac ttg gag cag atg cag aaa gtg aga 1705
Phe Gly Val Thr Leu Pro Glu Asn Leu Glu Gln Met Gln Lys Val Arg
515 520 525

ggg ttc aga tgt ggg aaa aaa tca aca gtc tca gtg gac aga gaa gaa 1753
Gly Phe Arg Cys Gly Lys Lys Ser Thr Val Ser Val Asp Arg Glu Glu
530 535 540

agc ccc aag gtt cta ata act gca ttc taacgaggtt tccaaggcac 1800
Ser Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe
545 550

ttggcaaact gaaaagcaga tgtatacaat gagcagggtg tgatagagca agcctgcaat 1860

cccagcgctc ttggggtgga gacagaagat caggagttca aggtcatcct tggctacagc 1920

aggagtgtaa gaccagcctg tcttaccaca agcaaccctg tctcaacaga acaaatcaaa 1980

41/52

agccttttct gctgaaaggg attaacagaa acaatgagca ccaaactgga ctgtggaga 2040

aatgcacact atctcatgaa ttctgggcca ctcttcaga tgg 2083

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 24

cccatgccaa caaggacaaa aagc 24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

42/52

<400> 25

acagaacaga aaagccctca gtca

24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial Synthesized Primer
Sequence

<400> 26

tgtttttcgt ggggtgtgctg atgg

24

<210> 27

<211> 557

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

43/52

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35

40

45

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50

55

60

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

65

70

75

80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly

85

90

95

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser

145

150

155

160

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr

44/52

165	170	175	
Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn			
180	185	190	
Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile			
195	200	205	
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys			
210	215	220	
Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala			
225	230	235	240
Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp			
245	250	255	
Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala			
260	265	270	
Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly			
275	280	285	
Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn			
290	295	300	

45/52

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305 310 315 320

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg

325 330 335

Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu

340 345 350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355 360 365

His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val

370 375 380

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385 390 395 400

Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405 410 415

Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val

420 425 430

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435 440 445

46/52

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 28

<211> 1888

<212> DNA

<213> Mus musculus

47/52

<220>

<221> CDS

<222> (60)..(1730)

<400> 28

ctcccgcgcc acggtgtccc cttattccca tacgggcgct gtgggaggct gaggacggc 59

atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc cta ggc gag tgg ggg ccc 107

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1 5 10 15

ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc aat 155

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20 25 30

ggc ttc aat ggt atg tcc atc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccg gag cac 203

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35 40 45

cgt tgc ctt gtg cct cac acc gtg aac ctg agc agc gcg tgg cgc aac 251

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50 55 60

cac agt atc ccg ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag aaa 299

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

48/52

65	70	75	80	
tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gag cta ggg				347
Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly				
	85	90	95	
ctg gag ccg ggg cgg gac gtg gac ctg gag cag ctg gag cag gag agc				395
Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser				
	100	105	110	
tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac gtc ttc ctg tcc acc atc				443
Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile				
	115	120	125	
gtg aca gag tgg gac ctg gtg tgt aag gat gac tgg aaa gcc cca ctc				491
Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu				
	130	135	140	
acc acc tcc ttg ttt ttc gtg ggt gtg ctg atg ggc tcc ttc att tca				539
Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser				
145	150	155	160	
gga cag ctc tca gac agg ttt ggt cgc aag aat gtg ctg ttt ttg acc				587
Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr				
	165	170	175	

49/52

atg ggc atg cag act ggc ttc agc ttc ctg cag gtc ttc tct gtg aac 635

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn

180

185

190

ttc gag atg ttt aca gtg ctt ttt gtc ctt gtt ggc atg ggt cag atc 683

Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

tcc aac tac gtg gca gca ttt gtc ctg gga aca gaa att ctt tcc aag 731

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

tca att cga att ata ttc gcc acc tta gga gtt tgc ata ttt tat gcg 779

Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala

225

230

235

240

ttt ggc ttc atg gtg ctg cca ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg 827

Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

agg atg ctg ctg ctg gcg ctc act gtg cca ggg gtg cta tgt ggg gct 875

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala

260

265

270

ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc cca cga tgg ctc atc tct caa ggc 923

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly

50/52

275	280	285	
cga att aaa gag gca gag gtg atc atc cgc aaa gct gcc aaa atc aat			971
Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn			
290	295	300	
ggg att gtt gca cct tcc act atc ttc gat cca agt gag tta caa gac			1019
Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp			
305	310	315	320
tta aat tct acg aag cct cag ttg cac cac att tat gat ctg atc cga			1067
Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg			
325	330	335	
aca cgg aat atc agg gtc atc acc atc atg tct ata atc ctg tgg ctg			1115
Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu			
340	345	350	
acc ata tca gtg ggc tat ttt gga cta tct ctt gac act cct aac ttg			1163
Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu			
355	360	365	
cat ggg gac atc tat gtg aac tgc ttc cta ctg gcg gct gtt gaa gtc			1211
His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val			
370	375	380	

51/52

cca gcc tat gtg ctg gcc tgg ctg ttg ttg cag tac ttg ccc cgg cga 1259

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385 390 395 400

tat tct atc tcg gct gcc ctt ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc ttc 1307

Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405 410 415

atg cag ctg gtg cct tca gaa ttg ttt tac ttg tcc act gcc ctg gtg 1355

Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val

420 425 430

atg gtg ggg aag ttt gga atc acc tct gcc tac tcc atg gtc tat gtg 1403

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435 440 445

tac aca gct gag ctg tac ccc act gtg gtc aga aac atg ggt gtg ggg 1451

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450 455 460

gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctt ggc agc atc ctg tct ccc tac ttt 1499

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465 470 475 480

gtt tac cta ggt gcc tat gat cgc ttc ctg cct tat att ctc atg gga 1547

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

52/52

485	490	495	
agt ctg acc atc ctg aca gct atc ctc acc ttg ttc ttc cct gag agc			1595
Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser			
500	505	510	
ttt ggt gtc cct ctc cca gat acc att gac cag atg cta agg gtc aaa			1643
Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys			
515	520	525	
gga ata aaa cag tgg caa atc caa agc cag aca aga atg caa aaa gat			1691
Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp			
530	535	540	
ggt gaa gaa agc cca aca gtc cta aag agc aca gcc ttc taacaccctg			1740
Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe			
545	550	555	
tccagaaggc aaaaaactga ttggaaacct tcatgttgtc agaaatgctc tccatgactg			1800
agggttttc tgttctgtta accttgtgtc taacatgctc atggattggg gcattgtgcc			1860
tggagagtca ctttcctcta gggacacc			1888

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12N5/10, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12N5/10, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), GENESEQ, PIR, SWISSPROT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	IKUMI TAMAI, HIKARU YABUUCHI, JUN-ICHI NEZU, YOSHIMICHI SAI, ASUKA OKU, MIYUKI SHIMANE, AKIRA TSUJI, "Cloning and characterization of a nobel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1", FEBS Letters, 1997, Vol. 419, No. 1, p.107-111	1-8
X, P	WU X., PRASAD P.D., LEIBACH F.H., GANAPATHY V., "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, Vol. 246, No. 3, p.589-595	1-8
A	JP, 8-81497, A (Hoechst AG.), 26 March, 1996 (26. 03. 96) & EP, 699753, A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search 1 October, 1998 (01. 10. 98)	Date of mailing of the international search report 13 October, 1998 (13. 10. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04009

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DIRK GRUNDEMANN, VALENTIN GORBOULEV, STEPHAN GAMBARYAN, MALKE VEVHL, HERMANN KOEPESELL, "Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter", Nature, 1994, Vol. 372, No. 8, p.549-552	1-8
A	MASAHIRO OKUDA, HIDEYUKI SAITO, YUMIKO URAKAMI, MIKIHISA TAKANO, KEN-ICHI INUI, "cDNA Cloning and Functional Expression of a Novel Rat Kidney Organic Cation Transporter, OCT2", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol. 224, No. 2, p.500-507	1-8
A, P	WO, 97/42321, A (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL, INC.), 13 November, 1997 (13. 11. 97) & AU, 9731200, A	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12N5/10, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12N5/10, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

GENESEQ, PIR, SWISSPROT

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	IKUMI TAMAI, HIKARU YABUCHI, JUN-ICHI NEZU, YOSHIMICHI SAI, ASU KA OKU, MIYUKI SHIMANE, AKIRA TSUJI, "Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1", FEBS Letters, 1997, Vol. 419, No. 1, p. 107-111	1-8
X, P	WU X., PRASAD P. D., LEIBACH F. H., GANAPATHY V., "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, Vol. 246, No. 3, p. 589-595	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.10.98

国際調査報告の発送日

13.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 8-81497, A (ヘキスト・アクチングゼルシャフト) 26. 3月. 1996 (26. 03. 96) & EP, 699753, A	1-8
A	DIRK GRUNDEMANN, VALENTIN GORBOULEV, STEPHAN GAMBARYAN, MALKE V EVHL, HERMANN KOEPEL, "Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter", Nature, 1994, Vol. 372, No. 8, p. 549-552	1-8
A	MASAHIRO OKUDA, HIDEYUKI SAITO, YUMIKO URAKAMI, MIKIHISA TAKANO, KEN-ICHI INUI, "cDNA Cloning and Functional Expression of a Novel Rat Kidney Organic Cation Transporter, OCT2", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol. 224, No. 2, p. 500-507	1-8
A, P	WO, 97/42321, A (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL, INC) 13. 11月. 1997 (13. 11. 97) & AU, 9731200, A	1-8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ ~~COLOR~~ OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.